

INPI

13 OCT 2004 41

MESA DE ENTRADAS



*Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

PATENTE DE INVENCION

Bajo el Acta Nro. .... **P 000105426** .....

Se ha dado entrada a una solicitud de PATENTE DE INVENCION.

Buenos Aires, ..... de 2000.

.....  
MESA DE ENTRADAS

OFFICIAL FILING  
CERTIFICATE

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0238787

**Memoria Descriptiva**  
de la  
**Patente de Invención**

**Sobre**  
***"LISOFOSFOLIPASA"***

**Solicitada por:**  
***NOVO NORDISK A/S, residente en Novo Allé, DK-  
2880 Bagsvaerd, DINAMARCA.***

205546  
CRF

**NZAS-0238788**

## LISOFOFOLIPASA

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con lisofosfolipasas (LPL), métodos para la producción y uso de las mismas, así como también con secuencias de ácido nucleico que las codifican.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las lisofosfolipasas (EC 3.1.1.5) son enzimas que pueden hidrolizar 2-lisofosfolípidos para liberar ácido graso. Se sabe que son útiles, por ejemplo, para perfeccionar la capacidad de filtración de una solución acuosa que contiene un hidrolizado de almidón, en particular un hidrolizado de almidón de trigo (EP 219.269).

N. Masuda y otros, Eur. J. Biochem., 202, 783 - 787 (1991) describen una LPL de *Penicillium notatum* como una glucoproteína que tiene una masa molecular de 95 kDa y una secuencia de aminoácidos publicada de 603 residuos de aminoácidos. La WO 98/31790 y la EP 808.903 describen LPL de *Aspergillus foetidus* y *Aspergillus niger*, cada una con una masa molecular de 36 kDa y una secuencia de aminoácidos de 270 aminoácidos.

La JP-A 10-155493 describe una fosfolipasa A1 de *Aspergillus oryzae*. La proteína madura tiene 269 aminoácidos.

### SUMARIO DE LA INVENCION

Los inventores han aislado lisofosfolipasas de *Aspergillus* (*A. niger* y *A. oryzae*) que tienen masas moleculares de aproximadamente 68 kSa y secuencias de aminoácidos de 600 - 604 residuos de aminoácidos. Las nuevas lisofosfolipasas tienen sólo una limitada homología con secuencias de

aminoácidos conocidas. Los inventores además aislaron genes que codifican a las nuevas enzimas y los clonaron en cepas de *E. coli*.

Por lo tanto, la invención proporciona una lisofosfolipasa que puede ser un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como el péptido maduro que se muestra en uno de los siguientes, o que puede obtenerse del mismo por sustitución, delección y / o inserción de uno o más aminoácidos, en particular por delección de 25 - 35 aminoácidos en el terminal C:

SEC ID NO: 2 (de aquí en adelante denotada *A. niger* LLPL-1),

SEC ID NO: 4 (de aquí en adelante denotada *A. niger* LLPL-2),

SEC ID NO: 6 (de aquí en adelante denotada *A. ozyzae* LLPL-1), o

SEC ID NO: 8 (de aquí en adelante denotada *A. ozyzae* LLPL-2).

Además, la lisofosfolipasa de la invención puede ser un polipéptido codificado por la parte codificadora de la lisofosfolipasa de la secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* depósito número DSM 13003, DSM 13004, DSM 13082 o DSM 13083.

La lisofosfolipasa además puede ser un análogo del polipéptido definido anteriormente que:

- i) tiene por lo menos 70 % de homología con dicho polipéptido,
- ii) es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo producido contra dicho polipéptido en forma purificada,
- iii) es una variante alélica de dicho polipéptido.

Finalmente, la fosfolipasa de la invención puede ser un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de alta severidad con una de las siguientes secuencias o su hebra complementaria o una subsecuencia de la misma de por lo menos 100 nucleótidos:

nucleótidos 109 - 1920 de SEC ID NO: 1 (que codifica a *A. niger* LLPL-1),

nucleótidos 115 - 1914 de SEC ID NO: 3 (que codifica a *A. niger* LLPL-2),

nucleótidos 70 - 1881 de SEC ID NO: 5 (que codifica a *A. oryzae* LLPL-1),

o

nucleótidos 193 - 2001 de SEC ID NO: 7 (que codifica a *A. oryzae* LLPL-2).

La secuencia de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica a cualquiera de las lisofosfolipasas que se describen anteriormente, o puede codificar a una lisofosfolipasa y comprender:

a) la parte codificadora de lisofosfolipasa de la secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* DSM 13003, 13004, DSM 13082 o DSM 13083 (codificando a *A. niger* LLPL-1, *A. niger* LLPL-2, *A. oryzae* LLPL-1 y *A. oryzae* LLPL-2, respectivamente),

b) la secuencia de ADN que se muestra en SEC ID NO: 1, 3, 5, ó 7 (que codifica a *A. niger* LLPL-1, *A. niger* LLPL-2, *A. oryzae* LLPL-1 y *A. oryzae* LLPL-2, respectivamente), o

c) un análogo de la secuencia de ADN que se define en a) o b) que

i) tiene por lo menos 70 % de homología con dicha secuencia de ADN, o

ii) hibrida a alta severidad con dicha secuencia de ADN, su hebra complementaria o una subsecuencia de la misma.

Otros aspectos de la invención proporcionan un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de ADN, y una célula transformada con la secuencia de ADN o el vector de expresión recombinante.

Una comparación con secuencias del arte previo de longitud completa muestra que las secuencias de aminoácidos maduras de la invención tienen 60 - 69 % de homología con LPL de *Penicillium notatum* (descrito anteriormente); y las secuencias de ADN correspondientes de la invención muestran 63 - 68 % de homología con la de LPL de *P. notatum*.

Una comparación con secuencias parciales publicadas muestra que una marca de secuencia expresada (EST) de *Aspergillus nidulans* (GenBank

AA965865) de 155 residuos de aminoácidos puede ser alineada con la *A. oryzae* LLPL-2 madura de la invención (604 aminoácidos) con una homología de 79 %.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

### Fuente de ADN Genómico

Las lisofosfolipasas de la invención pueden derivar de cepas de *Aspergillus*, en particular cepas de *A. niger* y *A. oryzae*, usando sondas diseñadas sobre la base de las secuencias de ADN en esta memoria descriptiva.

El organismo fuente que contiene genes que codifican lisofosfolipasa fue depositado por los inventores bajo los términos del Tratado de Budapest con el DSMZ - Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig DE, de la siguiente manera:

Organismo fuente	Designación de lisofosfolipasa	Número de acceso	Fecha de depósito
<i>A. niger</i>	LLPL-1	DSM 13003	18 de agosto de 1999
<i>A. niger</i>	LLPL-2	DSM 13004	18 de agosto de 1999
<i>A. oryzae</i>	LLPL-1	DSM 13082	8 de octubre de 1999
<i>A. oryzae</i>	LLPL-2	DSM 13083	8 de octubre de 1999

### Delección C-terminal

La lisofosfolipasa puede derivar del péptido maduro que se muestra en SEC ID NOS: 2, 4, 6 u 8, por delección en el terminal C para remover el residuo de sitio  $\omega$ , mientras que se preserva la actividad de lisofosfolipasa. El residuo de sitio  $\omega$  se describe en Yoda y otros, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 142 - 148, 2000, por ejemplo, S577 de SEC ID NO: 4. En consecuencia, la delección C-terminal puede consistir particularmente de 25 - 35 residuos de aminoácidos.

Una lisofosfolipasa con una delección de terminal C se puede producir particularmente por expresión en una cepa de *A. oryzae*.

### **Propiedades de la lisofosfolipasa**

La lisofosfolipasa de la invención es capaz de hidrolizar grupos acilo grasos en lisofosfolípido tal como liso-lecitina (Nomenclatura Enzimática EC 3.1.1.5). Además puede ser capaz de liberar ácidos grasos de fosfolípido intacto (por ejemplo, lecitina).

### **Vector de expresión recombinante**

El vector de expresión de la invención típicamente incluye secuencias de control que codifican a un promotor, operador, sitio de enlace ribosómico, señal de iniciación de traducción, y opcionalmente, un marcador de selección, un terminador de transcripción, un gen represor o varios genes activadores. El vector puede ser un vector autónomamente replicante, o puede ser integrado en el genoma de la célula huésped.

### **Producción por cultivación de transformante**

La lisofosfolipasa de la invención se puede producir transformando una célula huésped adecuada con una secuencia de ADN que codifica a la fosfolipasa, cultivando el organismo transformado bajo condiciones que permiten la producción de la enzima, y recuperando la enzima del cultivo.

El organismo huésped con preferencia es una célula eucariótica, en particular una célula fungal, tal como una célula de levadura o una célula fungal filamentosa, tal como una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* o *Saccharomyces*, en particular *A. niger*, *A. oryzae*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. cerealis* o *S. cerevisiae*, por ejemplo, una cepa productora de

glucoamilasa de *A. niger*, tales como aquellas que se describen en la Patente de los Estados Unidos 3677902, o una mutante de las mismas. La producción de la lisofosfolipasa en dichos organismos huéspedes puede hacerse por medio de los métodos generales que se describen en la EP 238.023 (Novo Nirdisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) o EP 244.234 (Alko).

### Hibridación

La hibridación se usa para indicar que una secuencia de ADN determinada es análoga a una sonda de nucleótidos correspondiente a una secuencia de ADN de la invención. Las condiciones de hibridación se describen en detalle a continuación.

Las condiciones adecuadas para la determinación de la hibridación entre una sonda de nucleótidos y una secuencia de ARN o ADN homóloga involucran el prerremojado del filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridar en 5 x SSC (salina citrato estándar) durante 10 min., y la prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC (Sambrook y otros 1989), 5 x solución de Denhardt (Sambrook y otros, 1989), 0,5 % SDS y 100 µg / ml de ADN de espermatozoos de salmón sonificado desnaturalizado (Sambrook y otros 1989), seguido de hibridación en la misma solución que contiene una sonda cebada al azar (Feinberg A. P. y Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132: 6 - 13), rotulada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP (actividad específica  $> 1 \times 10^9$  cpm / µg) durante 12 horas a aproximadamente 45 °C. El filtro luego se lava dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, 0,5 % SDS a una temperatura de por lo menos 55 °C, con más preferencia por lo menos 60 °C, con más preferencia por lo menos 65 °C, aún con más preferencia por lo menos 70 °C, especialmente por lo menos 75 °C.

Las moléculas a las cuales hibrida la sonda de oligonucleótidos bajo estas condiciones se detectan usando una película de rayos x.



### Alineación y homología

La lisofosfolipasa y la secuencia de nucleótidos de la invención con preferencia tienen homologías a las secuencias descritas de por lo menos 80 %, en particular por lo menos 90 %, o por lo menos 95 %, por ejemplo, por lo menos 98 %.

Para propósitos de la presente invención, las alineaciones de secuencias y los cálculos de las clasificaciones de homología se hicieron usando una alineación de Smith-Waterman completa, útil tanto para las alineaciones de ADN como de proteína. Se usan las matrices de clasificación por omisión (por default) BLOSUM50 y la matriz de identidad para las alineaciones de proteína y ADN, respectivamente. La penalidad para el primer residuo en un espacio es -12 para proteínas y -16 para ADN, mientras que la penalidad para residuos adicionales en un espacio es -2 para proteínas y -4 para ADN. La alineación es del paquete FASTA versión v20u6 (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Herramientas perfeccionadas para el análisis de secuencia biológica", PNAS 85: 2444 - 2448, y W. R. Pearson (1990) "Comparación de Secuencia Rápida y Sensible con FASTP y FASTA", Methods in Enzymology, 183: 63 - 98). Se hicieron múltiples alineaciones de secuencias de proteínas usando "ClustalW" (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: perfeccionamiento de la sensibilidad de la alineación de secuencia múltiple progresiva a través del peso de secuencia, penalidades de espacio específicas de posiciones y elección de matriz de peso. Nucleic Acids Research, 22: 4673 - 4680). La múltiple alineación de secuencias de ADN se hace usando la alineación de proteína como un patrón, reemplazando los aminoácidos con el correspondiente codón de la secuencia de ADN.

### **Actividad de lisofosfolipasa (LLU)**

La actividad de lisofosfolipasa se mide usando L- $\alpha$ -lisolecitina de yema de huevo como el sustrato, con un equipo de ensayo NEFA C.

Se mezclan 20  $\mu$ l de muestra con 100  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 20 mM (pH 4,5) y 100  $\mu$ l de solución de L- $\alpha$ -lisolecitina al 1 %, y se incuba a 55 °C durante 20 minutos. Después de 20 minutos, la mezcla de reacción se transfiere al tubo que contiene 30  $\mu$ l de Solución A en equipo NEFA precalentado a 37 °C. Después de 10 minutos de incubación a 37 °C, 600  $\mu$ l de Solución B en equipo NEFA se agregan a la mezcla de reacción y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. La actividad se mide a 555 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad de lisofosfolipasa (1 LLU) se define como la cantidad de enzima que puede incrementar el A550 de 0,01 por minuto a 55 °C.

### **Uso de lisofosfolipasa**

La lisofosfolipasa de la invención se puede usar en cualquier aplicación donde se desea hidrolizar el (los) grupo(s) acilo graso(s) de un fosfolípido o lisofosfolípido, tal como lecitina o liso-lecitina.

Como un ejemplo, la lisofosfolipasa de la invención se puede usar en la preparación de masa, pan y tortas, por ejemplo, para perfeccionar la elasticidad del pan o de la torta. Por lo tanto, la lisofosfolipasa se puede usar en un proceso para hacer pan, que comprende agregar la lisofosfolipasa a los ingredientes de una masa, amasar la masa y hornear la masa para hacer el pan. Esto se puede hacer de manera análoga a la Patente de los Estados Unidos 4.567.046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) o EP 426211 (Unilever).

La lisofosfolipasa de la invención también se puede usar para perfeccionar la capacidad de filtración de una solución acuosa o suspensión de origen de

hidrato de carbono, tratándola con la lisofosfolipasa. Esto es particularmente aplicable a una solución o suspensión que contiene un hidrolizado de almidón, especialmente un hidrolizado de almidón de trigo, ya que éste tiende a ser difícil de filtrar y a dar filtrados turbios. La lisofosfolipasa puede ser usada convenientemente junto con una beta-glucanasa y / o una xilanasa, por ejemplo, como se describe en la EP 219.269 (CPC International).

La lisofosfolipasa de la invención se puede usar en un proceso para la reducción del contenido de fosfolípido en un aceite comestible, que comprende tratar el aceite con la lisofosfolipasa de manera de hidrolizar una parte importante del fosfolípido, y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado, del aceite. Este proceso es aplicable a la purificación de cualquier aceite comestible que contiene fosfolípido, por ejemplo, aceite vegetal tal como aceite de haba de soja, aceite de semilla de colza y aceite de girasol. El proceso se puede conducir de acuerdo con los principios conocidos en el arte, por ejemplo, de manera análoga a la Patente de los Estados Unidos 5.264.367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM, 6 (12), 1284 - 91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol., 95 (8), 300 - 304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); o EP 654.527 (Metallgesellschaft, Röhm).

## **EJEMPLOS**

### **Materiales y métodos**

#### **Métodos**

A menos que se establezca de otra forma, las manipulaciones y transformaciones de ADN se efectuaron usando métodos estándares de biología molecular, como se describe en Sambrook y otros (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. y otros (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons,

1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for *Bacillus*", John Wiley and Sons, 1990.

### Enzimas

Las enzimas para las manipulaciones de ADN (por ejemplo, endonucleasas de restricción, ligasas, etc.) se pueden obtener de New England Biolabs, Inc., y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Plásmidos / vectores

pT7Blue (Invitrogen, Países Bajos)  
pUC19 (Genbank Acceso #: X02514)  
pYES 2.0 (Invitrogen, USA).

### Cepas microbianas

*E. coli* JM109 (TOYOBO, Japón)  
*E. coli* DH12 $\alpha$  (GIBCO BRL, Life Technologies, USA)

*Aspergillus oryzae* cepa IFO 4177 se encuentra disponible del Institute for Fermentation, Osaka (IFO) Culture Collection of Microorganisms, 17 - 85, Jusohonmachi, 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón.

*A. oryzae* BECh-2 se describe en la Solicitud de Patente Danesa PA 1999 01726. Es una mutante de JaL 228 (descrita en la WO 98/12300) que es una mutante de IFO 4177.

### Reactivos

Equipo de evaluación NEFA (Wako, Japón)  
L- $\alpha$ -lisolecitina (Sigma, USA).

### Medios y reactivos

Cove: 342,3 g / l Sacarosa, 20 ml / l solución salina COVE, 10 mM Acetamida, 30 g / l ágar noble.

Cove-2: 30 g / l Sacarosa, 20 ml / l solución salina COVE, 10 mM Acetamida, 30 g / l ágar noble.

Solución salina Cove: por litro 26 g KCl, 26 g MgSO<sub>4</sub>-7 aq, 76 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 ml metales de trazo Cove.

Metales de trazo Cove: por litro 0,04 g NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> - 10 aq, 0,4 g CuSO<sub>4</sub>-5aq, 1,2 g FeSO<sub>4</sub>-7aq, 0,7 g MnSO<sub>4</sub>-aq, 0,7 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>2</sub>-2aq, 0,7 g ZnSO<sub>4</sub>-7aq.

Metales de trazo AMG: por litro 14,3 g ZnSO<sub>4</sub>-7aq, 2,5 g CuSO<sub>4</sub>-5aq, 0,5 g NiCl<sub>2</sub>, 13,8 g FeSO<sub>4</sub>, 8,5 g MnSO<sub>4</sub>, 3,0 ácido cítrico.

YPG: 4 g / l extracto de levadura, 1 g / l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g / l MgSO<sub>4</sub>-7aq, 5 g / l Glucosa, pH 6,0.

STC: 0,8 M Sorbitol, 25 mM Tris pH 8, 25 mM CaCl<sub>2</sub>.

STPC: 40 % PEG4000 en buffer STC.

Agarosa superior Cove: 342,3 g / l Sacarosa, 20 ml / l solución salina COVE, 10 mM Acetamida, 10 g / l agarosa de baja fusión.

MS-9: por litro 30 g polvo de haba de soja, 20 g glicerol, pH 6,0.

MDU-pH 5: por litro 45 g maltosa-1aq, 7 g extracto de levadura, 12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g MgSO<sub>4</sub>-7aq, 2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 ml solución de metal de trazo AMG y 25 g ácido 2-morfolinoetanosulfónico, pH 5,0.

MLC: 40 g / l Glucosa, 50 g / l polvo de haba de soja, 4 g / l ácido cítrico, pH 5,0.

MU-1: 260 g / l Maltodextrina, 3 g / l MgSO<sub>4</sub>-7aq, 6 g / l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g / l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 ml / l solución de metal de trazo AMG, 2 g / l Urea, pH 4,5.

### **Ejemplo 1: Clonación y expresión de gen LLPL-1 de *A. niger***

#### **Transformación en cepa de *Aspergillus***

Se inoculó *Aspergillus oryzae* cepa BECh-2 con 100 ml de medio YPG, y se incubó durante 16 horas a 32 °C a 120 rpm. Se recolectaron los pellets y se

lavarón con 0,6 M KCl, y se resuspendieron 20 ml de KCl 0,6 M que contenía un producto de  $\beta$ -glucanasa comercial (Glucanex, producto de Novo Nordisk A / S) a la concentración de 30  $\mu$ l / ml. Los cultivos se incubaron a 32 °C a 60 rpm hasta que se formaron protoplastos, luego se lavaron con buffer STC dos veces. Los protoplastos se contaron con un hematómetro y se resuspendieron en una solución 8 : 2 : 0,1 de STC : STPC : DMSO a una concentración final de  $2,5 \times 10^7$  protoplastos / ml. Aproximadamente 3  $\mu$ g de ADN se agregaron a 100  $\mu$ g de solución de protoplastos, se mezcló moderadamente y se incubó sobre hielo durante 30 minutos. Se agregó un ml de SPTC y se incubó 30 minutos a 37 °C. Luego de la adición de 10 ml de agarosa superior Cove a 50 °C, la reacción se volcó sobre placa de ágar Cove. Las placas de transformación se incubaron a 32 °C durante 5 días.

#### Preparación de una sonda lrp1

Se usó una cepa de *Aspergillus niger* como un suministrador de ADN genómico. Se hicieron reacciones de PCR en ADN de genoma de *Aspergillus niger*, con los cebadores HU175 (SEC ID NO: 9) y HU176 (SEC ID NO: 10), diseñados en base a la alineación de varias lisofosfolipasas de *Penicillium* y *Neurospora* sp.

Los componentes de la reacción (1 ng /  $\mu$ l de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U /  $\mu$ l en polimerasa Taq en 1 x buffer (Roche Diagnostics, Japón)), se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2	92 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de tamaño esperado, 1,0 kb, fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA (Qiagen, Alemania), y ligado en un vector pT7Blue con elevación de ligación (TOYOBO, Japón). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pHUda94) se secuenció y se comparó con la lisofosfolipasa de *Penicillium*, demostrando que un clon codifica la parte interna de la lisofosfolipasa.

#### Clonación de gen *llpl-1*

Para clonar la parte que falta del gen de lisofosfolipasa, se construyó un mapa de restricción genómica usando el fragmento de PCR como sondas para un Southern blot de ADN de *Aspergillus niger* digerido con siete enzimas de restricción, separadamente y sondeado con fragmento de 1,0 kb que codifica lisofosfolipasa parcial de pHUda94.

Un fragmento SphI de 4 - 6 kb hibridado se seleccionó para un subclón de gen *llpl-1*.

Para la construcción de una genoteca parcial de *Aspergillus niger*, el ADN genómico fue digerido con SphI y se lo hizo correr en un gel de agarosa al 0,7 %. El ADN con un tamaño entre 4 y 6 kb fue purificado y clonado en pUC19 pretratado SphI y BAP (fosfatasa alcalina bacteriana). La sub-biblioteca sphI se

hizo transformando los clones ligados en células DH12  $\alpha$  de *E. coli*. Las colonias se hicieron crecer en membranas Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Japón) y se hibridaron a fragmento de 1,0 kb rotulado con DIG (isótopo no radio) de pHUda94.

Se recogieron las colonias positivas y se revisaron sus inserciones por PCR. Se prepararon plásmidos de colonias seleccionadas y se secuenciaron, revelando que el fragmento SphI de 5 kb contenía gen *llpl-1* entero.

#### Expresión de gen *llpl-1* en *Aspergillus oryzae*

La región codificadora del gen LLPL-1 se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *Aspergillus niger* por PCR, con los cebadores HU188 (SEC ID NO: 11) y HU189 (SEC ID NO: 12) que incluían un sitio enzimático de restricción EcoRV y un XhoI, respectivamente.

Los componentes de la reacción (1 ng /  $\mu$ l de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U /  $\mu$ l en polimerasa Taq en 1X buffer (Roche Diagnostics, Japón)) se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2	92 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de 2 kb fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA, y ligado en un vector pT7Blue con elevación de ligación. La mezcla de



ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pLLPL1) se secuenció. Se confirmó que en el pLLPL1 no se habían producido cambios en las secuencias de LLPL-1.

El pLLPL1 fue digerido con EcoRV y XhoI y ligado en los sitios NruI y XhoI en un cassette de expresión de *Aspergillus* (pCaH) que tiene promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, secuencias líder de TPI de *Aspergillus nidulans*, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen amdS de *Aspergillus nidulans* como un marcador. El plásmido resultante se denominó pHUda103.

El plásmido de expresión de LLPL-1, pHUda103, fue digerido con NotI, y un fragmento de ADN de aproximadamente 6,1 kb que contenía promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, región codificadora de LLPL-1, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen amdS de *Aspergillus nidulans*, fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA.

El fragmento de ADN de 6,1 kb fue transformado en *Aspergillus oryzae* BECh-2. Los transformantes seleccionados se inocularon en 100 ml de medio MS-9 y se cultivaron a 30 °C durante 1 día. Se inocularon 3 ml de células desarrolladas en medio MS-9, a 100 ml de medio MDU-pH5, y se cultivó a 30 °C durante 3 días. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación. La célula se abrió por mezcla con el volumen equivalente de buffer de reacción (50 mM KPB-pH 6,0) y cuentas de vidrio durante 5 minutos sobre hielo, y los restos se removieron por centrifugación.

La productividad de lisofosfolipasa de transformantes seleccionados fue determinada como el índice de hidrólisis de L- $\alpha$ -lisolecitina, a pH 4,5 y 55 °C, medido en unidades por ml relativa a la actividad de la cepa huésped, BECh-2 que es normalizada a 1,0. Los resultados que se muestran en la tabla a continuación demuestran claramente la ausencia de incrementada actividad de

lisofosfolipasa en sobrenadantes, y la presencia de incrementada actividad de lisofosfolipasa en extractos libres de células.

Cepa	Rendimiento (sobrenadante) Actividad relativa	Rendimiento (fracción celular) Actividad relativa
BECh-2	1,0	1,0
LP3	1,0	4,5
	1,0	4,0
LP8	1,0	6,5
	1,0	5,5

## Ejemplo 2: Clonación y expresión de gen LLPL-2 de *A. niger*

### Preparación de una sonda de Ilp2

Se usó la misma cepa de *Aspergillus niger* que en el Ejemplo 1 como un suministrador de ADN genómico.

Las reacciones de PCR en ADN genómico de *Aspergillus niger* se hicieron con los cebadores HU212 (SEC ID NO: 13) y HU213 (SEC ID NO: 14) diseñados en base a las secuencias de aminoácidos de lisofosfolipasa purificada de AMG 400L (descrito en el Ejemplo 4).

Los componentes de la reacción (1 ng /  $\mu$ l de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U /  $\mu$ l en polimerasa Taq en 1X buffer (Roche Diagnostics, Japón)), se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2	92 °C	1 min
3	50 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de tamaño esperado, 0,6 kb, fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA (Qiagen, Alemania), y ligado en un vector pT7Blue con elevación de ligación (TOYOBO, Japón). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pHUda114) se secuenció y se comparó con la lisofosfolipasa de *Penicillium*, demostrando que un clon codifica la parte interna de la lisofosfolipasa.

#### Clonación de gen *llpl-2*

Para clonar la parte que falta del gen de lisofosfolipasa, se construyó un mapa de restricción genómica usando el fragmento de PCR como sondas para un Southern blot de ADN de *Aspergillus niger* digerido con siete enzimas de restricción, separadamente y sondeado con fragmento de 1,0 kb que codifica lisofosfolipasa parcial de pHUda114.

Un fragmento XbaI de 4 - 6 kb hibridado se seleccionó para un subclón de gen *llpl-2*.

Para la construcción de una genoteca parcial de *Aspergillus niger*, el ADN genómico fue digerido con XbaI y se lo hizo correr en un gel de agarosa al 0,7 %. El ADN con un tamaño entre 4 y 6 kb fue purificado y clonado en pUC19 pretratado XbaI y BAP (fosfatasa alcalina bacteriana). La sub-biblioteca XbaI se

hizo transformando los clones ligados en células DH12  $\alpha$  de *E. coli*. Las colonias se hicieron crecer en membranas Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Japón) y se hibridaron a fragmento de 1,0 kb rotulado con DIG (isótopo no radio) de pHUda114.

Se recogieron las colonias positivas y se revisaron sus inserciones por PCR. Se prepararon plásmidos de colonias seleccionadas y se secuenciaron, revelando que el fragmento XbaI de 5 kb contenía gen *llpl-2* entero.

#### Expresión de gen *llpl-2* en *Aspergillus oryzae*

La región codificadora del gen LLPL-2 se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *Aspergillus niger* por PCR, con los cebadores HU225 (SEC ID NO: 15) y HU226 (SEC ID NO: 16) que incluían un sitio enzimático de restricción BglII y un PmeI, respectivamente.

Los componentes de la reacción (1 ng /  $\mu$ l de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U /  $\mu$ l en polimerasa Taq en 1X buffer (Roche Diagnostics, Japón)) se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2	92 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de 2 kb fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA, y ligado en un vector pT7Blue con elevación de ligación. La mezcla de

ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pLLPL2) se secuenció. Se confirmó que en el pLLPL2 no se habían producido cambios en las secuencias de LLPL-2.

El pLLPL2 fue digerido con BglII y PmeI y ligado en los sitios BamHI y NruI en el cassette de expresión de *Aspergillus* pCaHj483 que tiene promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, secuencias líder de TPI de *Aspergillus nidulans*, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen amdS de *Aspergillus nidulans* como un marcador. El plásmido resultante fue pHUda123.

El plásmido de expresión de LLPL-2, pHUda123, fue digerido con NotI, y un fragmento de ADN de aproximadamente 6,0 kb que contenía promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, región codificadora de LLPL-2, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen amdS de *Aspergillus nidulans*, fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA.

El fragmento de ADN de 6,0 kb fue transformado en *Aspergillus oryzae* BECh-2. Los transformantes seleccionados se inocularon en 100 ml de medio MS-9 y se cultivaron a 30 °C durante 1 día. Se inocularon 3 ml de células desarrolladas en medio MS-9, a 100 ml de medio MDU-pH5, y se cultivó a 30 °C durante 4 días.

El sobrenadante se obtuvo por centrifugación. La célula se abrió por mezcla con el volumen equivalente de buffer de reacción (50 mM KPB-pH 6,0) y cuentas de vidrio durante 5 minutos sobre hielo, y los restos se removieron por centrifugación.

La productividad de lisofosfolipasa de transformantes seleccionados fue determinada como en el Ejemplo 1. Los resultados que se muestran en la tabla a continuación demuestran claramente la ausencia de incrementada actividad de lisofosfolipasa en sobrenadantes, y la presencia de incrementada actividad de lisofosfolipasa en extractos libres de células.

Cepa	Rendimiento (sobrenadante) Actividad relativa	Rendimiento (fracción celular) Actividad relativa
BECh-2	1,0	1,0
Fg-9	1,0	22,5
Fg-15	1,0	18,0
Fg-27	1,0	17,0
Fg-33	1,0	14,5

### Ejemplo 3: Clonación y expresión de genes LLPL de clones de *E. coli*

Cada uno de los siguientes genes de lisofosfolipasa de peso molecular grande (LLPL) es clonado a partir del clon de *E. coli* indicado como suministrador de ADN genómico, y el gen es expresado en *A. oryzae* como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Clon de <i>E. coli</i>	LLPL
DSM 13003	<i>A. niger</i> LLPL-1
DSM 13004	<i>A. niger</i> LLPL-2
DSM 13082	<i>A. oryzae</i> LLPL-1
DSM 13083	<i>A. oryzae</i> LLPL-2

### Ejemplo 4: Aislación de *A. niger* LLPL-2 de AMG 300L

#### Purificación de LLPL-2 de AMG 300L

Una preparación de glucoamilasa comercialmente disponible de *A. niger* (AMG 300L, producto de Novo Nordisk A/S) fue diluida 10 veces con agua Milli-Q y posteriormente se agregó sulfato de amonio a 80 % de saturación. La solución se agitó 1 hora a 4 °C, seguido de centrifugación en una centrífuga Sorvall RC-3B, equipada con una cabecera giratoria (4500 rpm por espacio de 35 minutos). Se

desechó el precipitado y el sobrenadante se dializó contra 50 mM acetato de sodio, pH 5,5. La solución dializada se aplicó a una columna de Q-Sepharose (2,6 x 4 cm) en 50 mM acetato de sodio, pH 5,5, a un índice de flujo de 300 ml h<sup>-1</sup>. La columna se lavó (10 x volumen de columna) y se eluyeron las proteínas usando un gradiente lineal de 0 - 0,35 M NaCl en 50 mM acetato de sodio, pH 5,5, a un índice de flujo de 300 ml h<sup>-1</sup>. Las fracciones que contenían actividad se reunieron, se concentraron en una celda Amicon (corte 10 kDa) a 2,5 ml y se aplicó a Superdex 200 H/R (1,6 x 60 cm) en 0,2 mM acetato de sodio, pH 5,5, drenando en el lecho. Las proteínas se eluyeron isocráticamente a un índice de flujo de 30 ml h<sup>-1</sup>. La enzima purificada mostró una actividad específica de 86 LLU / mg.

El análisis SDS-PAGE mostró tres bandas de proteína a alrededor de 40, 80 y 120 kDa. El secuenciamiento N-terminal de los primeros 23 aminoácidos reveló que las bandas de proteína a 40 y 120 kDa tenían secuencias idénticas (mostrado en el N-terminal de SEC ID NO: 4), mientras que la banda de proteína a 80 kDa demostró tener la secuencia que se muestra como SEC ID NO: 19. El análisis IEF mostró que LLPL-2 tenía un pI de alrededor de 4,2.

#### Caracterización Enzimática de LLPL-2

LLPL-2 demostró tener un perfil de actividad de pH de forma de campana, con óptima actividad a pH 4,0. La temperatura óptima se halló a 50 °C. La actividad enzimática fue completamente estable a pH 4,5, después de hasta 120 horas de incubación a pH 4,5 y 50 °C. LLPL-2 además es completamente estable a 50 °C, mientras que se determinó un período de vida de 84 horas a 60 °C. No se halló que LLPL-2 fuera dependiente de la adición de sales minerales como sodio o calcio.

**Ejemplo 5: Identificación y secuenciamiento de genes LLPL-1 y LLPL-2 de *A. oryzae***

### Cultivación de *A. oryzae*

La cepa de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 se desarrolló en dos fermentadores de laboratorio de 20 litros, en una escala de 10 litros a 34 °C, usando extracto de levadura y dextrosa en el medio del lote, y jarabe de maltosa, urea, extracto de levadura y metales de trazo en la alimentación. Los micelios fungales del primer fermentador de laboratorio se recolectaron por filtración, a través de un filtro de celulosa (tamaño de poro 7 - 11 micrones) después de 27 horas, 68,5 horas, 118 horas y 139 horas de crecimiento. Las condiciones para el crecimiento para el segundo fermentador fueron idénticas a las del primero, excepto por un índice de crecimiento más lento durante las primeras 20 horas de fermentación. Los micelios fungales del segundo fermentador de laboratorio se recolectaron como se describe anteriormente, después de 68,3 horas de crecimiento. Los micelios recolectados se congelaron de inmediato en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C.

La cepa de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 también se desarrolló en cuatro fermentadores de laboratorio de 20 litros en una escala de 10 litros, a 34 °C, usando sacarosa en el medio de lote, y jarabe de maltosa, amoníaco y extracto de levadura en la alimentación. La primera de las cuatro fermentaciones se llevó a cabo a pH 4,0, La segunda de las fermentaciones se llevó a cabo a pH 7,0 con un índice de agitación constante bajo (550 rpm) para lograr el rápido desarrollo de metabolismo reductivo. La tercera de las cuatro fermentaciones se llevó a cabo a pH 7,0, bajo crecimiento limitado de fosfato, disminuyendo la cantidad de fosfato y extracto de levadura agregada al medio de lote. La cuarta de las cuatro fermentaciones se llevó a cabo a pH 7,0 y a 39 °C. Después de 75 horas de fermentación, la temperatura se bajó hasta 34 °C. A 98 horas de fermentación, la adición de alimentación de carbono se detuvo, y el cultivo se dejó reposar durante las últimas 30 horas de la fermentación. Las muestras miceliales fungales de los



cuatro fermentadores de laboratorio entonces se recolectaron como se describe anteriormente, se congelaron de inmediato en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C.

La cepa de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 también se desarrolló en filtros Whatman colocados en placas de ágar Cove-N durante dos días. Los micelios se recolectaron, se congelaron de inmediato en N<sub>2</sub> líquido, y se almacenaron a -80 °C.

La cepa de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 también se desarrolló a 30 °C en recipientes de sacudido de 150 ml que contenían medio RS-2 (Kofod y otros, 1994, *Journal of Biological Chemistry* 269: 29182 - 29189) o un medio mínimo definido. Los micelios fungales se recolectaron luego de 5 días de crecimiento en el medio RS-2, y 3 y 4 días de crecimiento en el medio mínimo definido, se congelaron de inmediato en N<sub>2</sub> líquido, y se almacenaron a -80 °C.

#### Construcción de bibliotecas de ADNc direccional de *Aspergillus oryzae*

Se preparó ARN total por extracción con tiocianato de guanidinio, seguido de ultracentrifugación a través de un almohadón de CsCl de 5,7 M (Chirgwin y otros, 1979, *Biochemistry* 18: 5294 - 5299), usando las siguientes modificaciones. Los micelios congelados se molieron en N<sub>2</sub> líquido hasta un polvo fino, con un mortero y un majadero, seguido de molienda en un molino de café preenfriado, y se suspendió de inmediato en 5 volúmenes de buffer de extracción de ARN (4 M tiocianato de guanidinio, laurilsarcosina de sodio al 0,5 %, 25 mM citrato de sodio pH 7,0, 0,1 M β-mercaptoetanol). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó (20 minutos a 10.000 rpm, Beckman) para pelletizar los restos celulares. El sobrenadante se recolectó, se estratificó cuidadosamente en un almohadón de CsCl 5,7 M (5,7 M CsCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, 0,1 % DEPC; autoclavado antes del uso), usando 26,5 ml de sobrenadante por 12,0 ml de almohadón CsCl, y se centrifugó para obtener el ARN total (rotor

Beckman, SW 28, 25.000 rpm, temperatura ambiente, 24 horas). Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue cuidadosamente removido y la parte inferior del tubo que contenía el pellet de ARN se cortó y se enjuagó con etanol al 70 %. El pellet de ARN total se transfirió a un tubo de Eppendorf, se suspendió en 500 ml de TE, pH 7,6 (si fuera dificultoso, calentar ocasionalmente durante 5 minutos a 65 °C), se extrajo con fenol y se precipitó con etanol durante 12 horas a -20 °C (2,5 volúmenes de etanol, 0,1 volumen de 3 M acetato de sodio pH 5,2). El ARN se recolectó por centrifugación, se lavó en etanol al 70 % y se resuspendió en un volumen mínimo de DEPC. La concentración de ARN se determinó midiendo  $OD_{260/280}$ .

El poli(A)<sup>+</sup> ARN fue aislado por cromatografía de afinidad de oligo(dT)-celulosa (Aviv & Leder, 1972, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69: 1408 -1402). Un total de 0,2 g de oligo(dT) celulosa (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) fue predilatado en 10 ml de 1x de buffer de carga de columna (20 mM Tris-Cl, pH 7,6, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS), cargado en una columna de plástico taponada, tratada con DEPC (Columna de Cromatografía Poly Prep, BioRad, Hercules, CA), y equilibrada con 20 ml de 1x buffer de carga. El ARN total (1 - 2 mg) se calentó a 65 °C durante 8 minutos, se templó sobre hielo por espacio de 5 minutos, y luego de la adición de 1 volumen de 2x buffer de carga de columna a la muestra de ARN fue cargado sobre la columna. El eluato se recolectó y se recargó 2 - 3 veces calentando la muestra como se indica anteriormente y templando sobre hielo antes de cada carga. La columna de oligo(dT) se lavó con 10 volúmenes de 1x buffer de carga, luego con 3 volúmenes de buffer de sal de medio (20 mM Tris-Cl, pH 7,6, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS), seguido de la elución del poli(A)<sup>+</sup> ARN con 3 volúmenes de buffer de elución (10 mM Tris-Cl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,05 % SDS) precalentado hasta 65 °C, recolectando fracciones de 500 µl. El  $OD_{260}$  se leyó para cada

fracción recolectada, y las fracciones que contenían ARNm se reunieron y se precipitaron con etanol a -20 °C durante 12 horas. El poli(A)<sup>+</sup> ARN fue recogido por centrifugación, resuspendido en DEPC-DIW y almacenado en alícuotas de 5 - 10 mg a -80 °C.

El ADNc de doble filamento fue sintetizado a partir de 5 µg de poli(A)<sup>+</sup> ARN de IFO 4177 de *Aspergillus oryzae*, por medio del método de RNasa H (Gubler y Hoffman 1983, *supra*; Sambrook y otros, 1989, *supra*), usando una modificación de hebilla. El poli(A)<sup>+</sup> ARN (5 µg en 5 µl de agua tratada con DEPC) se calentó a 70 °C durante 8 minutos en un tubo Eppendorf libre de RNasa, presiliconizado, se templó sobre hielo, y se combinó en un volumen final de 50 µl con buffer de transcriptasa inversa (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT) que contenía 1 mM de dATP, dGTP y dTTP, y 0,5 mM de 5-metil-dCTP, 40 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana, 4,81 µg de cebador oligo(dT)<sub>18</sub>-NotI y 1000 unidades de transcriptasa inversa RNasa H SuperScript II.

El ADNc de primer filamento fue sintetizado incubando la mezcla de reacción a 45 °C durante 1 hora. Luego de la síntesis, la mezcla híbrida de ARNm : ADNc se filtró por gel a través de una columna de giro Pharmacia MicroSpin S-400 HR, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Luego de la filtración del gel, los híbridos se diluyeron en 250 µl de buffer de segunda hebra (20 mM Tris-Cl pH 7,4, 90 mM KCl, 4,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,16 mM βNAD<sup>+</sup>) que contenía 200 IM de cada uno de dNTP, 60 unidades de polimerasa I de ADN de *E. coli* (Pharmacia, Uppsala, Suecia), 5,25 unidades de RNasa H y 15 unidades de ligasa de ADN de *E. coli*. La síntesis de ADNc de segunda hebra se efectuó por incubación del tubo de reacción a 16 °C durante 2 horas, y un adicional de 15 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo por adición de EDTA a 20 mM concentración final, seguido de fenol y extracciones de cloroformo.

El ADNc de doble filamento fue precipitado por etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por espacio de 12 horas, por adición de 2 volúmenes de etanol al 96 % y 0,2 volumen de 10 M acetato de amonio, recuperado por centrifugación, lavado en etanol al 70 %, secado (SpeedVac) y resuspendido en 30 ml de buffer de nucleasa de haba Mung (30 mM acetato de sodio pH 4,6, 300 mM NaCl, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0,35 mM ditioneitol, 2 % glicerol) que contenía 25 unidades de nucleasa de haba Mung. El ADN de hebillas de filamento simple se recortó incubando la reacción a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, seguido de la adición de 70 ml de 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA, extracción de fenol y precipitación de etanol con 2 volúmenes de etanol al 96 % y 0,1 volumen de 3 M acetato de sodio pH 5,2 sobre hielo por espacio de 30 minutos.

Los ADNc de doble filamento se recuperaron por centrifugación (20.000 rpm, 30 minutos) y se despuntaron con polimerasa de ADN T4 en 30  $\mu\text{l}$  de buffer de polimerasa de ADN T4 (20 mM Tris-acetato, pH 7,9, 10 mM acetato de magnesio, 50 mM acetato de potasio, 1 mM ditioneitol) que contenía 0,5 mM de cada uno de dNTP y 5 unidades de polimerasa de ADN T4, incubando la mezcla de reacción a  $+16^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. La reacción se detuvo por medio de la adición de EDTA a 20 mM concentración final, seguido de fenol y extracciones de cloroformo y precipitación de etanol por espacio de 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , agregando 2 volúmenes de etanol al 96 % y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2.

Luego de la reacción de relleno, los ADNc se recuperaron por centrifugación como se indica anteriormente, se lavó en etanol al 70 %, y el pellet de ADN se secó en un SpeedVac. El pellet de ADNc se resuspendió en 25  $\mu\text{l}$  de buffer de ligación (30 mM Tris-Cl, pH 7,8, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ditioneitol, 0,5 mM ATP) que contenía 2  $\mu\text{g}$  adaptadores EcoRI (0,2  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ , Pharmacia, Uppsala, Suecia) y 20 unidades de ligasa T4, por incubación de la mezcla de reacción a  $16^{\circ}\text{C}$  por espacio de 12 horas. La reacción se detuvo calentando a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 20

minutos, y luego se colocó sobre hielo durante 5 minutos. El ADNc adaptado fue digerido con *NotI* por adición de 20 µl de agua autoclavada, 5 µl de 10x buffer de enzima de restricción *NotI* y 50 unidades de *NotI*, seguido de la incubación durante 3 horas a 37 °C. La reacción se detuvo calentando la muestra a 65 °C durante 15 minutos. Los ADNc se fraccionaron por tamaño por medio de electroforesis de gel de agarosa, en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión SeaPlaque GTG 0,8 % (FMC, Rockland, ME) en 1x TBE (en agua autoclavada) para separar los adaptadores no ligados y los ADNc pequeños. El gel se hizo correr durante 12 horas a 15 V, y el ADNc se seleccionó por tamaño con un corte a 0,7 kb, cortando la parte inferior del gel de agarosa. Luego se volcó un gel de agarosa 1,5 % en frente del gel que contenía ADNc, y los ADNc de doble filamento se concentraron haciendo correr el gel hacia atrás, hasta que apareció como una banda comprimida sobre el gel. El trozo de gel que contenía ADNc se cortó del gel, y se extrajo el ADNc del gel usando el equipo de purificación de banda de gel GFX (Amersham, Arlington Heights, IL) de la siguiente manera. Se pesó el gel sílice recortado en un tubo Eppendorf Biopure de 2 ml, luego 10 ml de Buffer de Captura se agregaron para cada 10 mg de gel sílice, el gel sílice se disolvió por incubación a 60 °C durante 10 minutos, hasta que la agarosa se solubilizó por completo, la muestra en la parte inferior del tubo por breve centrifugación. La muestra fusionada fue transferida a la columna de giro GFX colocada en un tubo de recolección, incubada a 25 °C durante 1 minuto, y luego se la hizo girar a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 30 segundos. Se desechó el flujo, y la columna se lavó con 500 µl de buffer de lavado, seguido de centrifugación a velocidad máxima por espacio de 30 segundos. El tubo de recolección se desechó, y la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, seguido de la elución del ADNc por medio de la adición de 50 µl de TE pH 7,5 al centro de la columna, incubación a 25 °C durante 1 minuto,

y finalmente por centrifugación durante 1 minuto a máxima velocidad. El ADNc eluido se almacenó a -20 °C hasta la construcción de la biblioteca.

Una preparación de ADN plásmido para un clon de ADNc pYES2.0 que contiene inserción *EcoRI*-*NotI*, fue purificada usando un QIAGEN Tip-100 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN, Valencia, CA). Un total de 10 mg de ADN plásmido purificado fue digerido hasta finalización con *NotI* y *EcoRI*, en un volumen total de 60  $\mu$ l, por adición de 6 ml de 10x NEBuffer para *EcoRI* (New England Biolabs, Beverly, MA), 40 unidades de *NotI* y 20 unidades de *EcoRI*, seguido de incubación durante 6 horas a 37 °C. La reacción se detuvo calentando la muestra a 65 °C durante 20 minutos. El ADN plásmido digerido se extrajo una vez con fenol-cloroformo, luego con cloroformo, seguido de precipitación de etanol durante 12 horas a -20 °C, agregando 2 volúmenes de etanol al 96 % y 0,1 volumen de 3 M acetato de sodio pH 5,2. El ADN precipitado se resuspendió en 25 ml de 1x TE pH 7,5, se cargó en un gel de agarosa SeaKem al 0,8 % en 1 x TBE, y se hizo correr en el gel durante 3 horas a 60 V. El vector digerido se cortó del gel, y el ADN se extrajo del gel usando el equipo de purificación de banda de gel GFX (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego de medir la concentración de ADN por OD<sub>260/280</sub>, el vector eluido fue almacenado a -20 °C hasta la construcción de la biblioteca.

Para establecer las condiciones de ligación óptimas para la biblioteca de ADNc, se llevaron a cabo cuatro ligaciones de evaluación en 10  $\mu$ l de buffer de ligación (30 mM Tris-Cl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP) que contenía 7  $\mu$ l de ADNc de doble filamento (correspondiente a aproximadamente 1/10 del volumen total en la muestra de ADNc), 2 unidades de ligasa T4 y 25 ng, 50 ng y 75 ng de vector pYES2.0 disociado con *EcoRI*-*NotI*, respectivamente (Invitrogen). La reacción de ligación de control de fondo de vector contenía 75 ng

de vector pYES2.0 disociado con *EcoRI*-*NotI*, sin ADNc. Las reacciones de ligación se efectuaron por incubación a 16 °C durante 12 horas, calentadas a 65 °C durante 20 minutos, y luego se agregaron 10 µl de agua autoclavada a cada tubo. Se sometió a electroporación un il de las mezclas de ligación (200 W, 2,5 kV, 25 mF) a 40 µl células DH10B de *E. coli* electrocompetentes (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Luego de la adición de 1 ml de SOC a cada mezcla de transformación, la células se desarrollaron a 37 °C durante 1 hora, 50 µl y 5 µl de cada electroporación se colocaron en placa en placas LB suplementadas con ampicilina a 100 µg por ml y se desarrolló a 37 °C durante 12 horas. Usando las condiciones óptimas, 18 bibliotecas de ADNc de IFO 4177 de *Aspergillus oryzae* que contenían  $1-2,5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias independientes se establecieron en *E. coli*, con un fondo de vector de ca. 1 %. La biblioteca de ADNc se almacenó como (1) reuniones individuales (25.000 c.f.u. / reunión) en 20 % glicerol a -80 °C; (2) pellets celulares de las mismas reuniones a -20 °C; (3) ADN plásmido purificado por Qiagen, de reuniones individuales a -20 °C (Qiagen Tip 100); y (4) ADNc de doble filamento direccional a -20 °C.

Preparación de Patrón de EST de *Aspergillus oryzae* (marca de secuencia expresada)

De cada biblioteca de ADNc descrita, se recogieron colonias transformantes directamente de las placas de transformación en platos microtituladores de 96 recipientes (QIAGEN, GmbH, Hilden Alemania) que contenían 200 µl caldo TB (Life Technologies, Frederick Maryland) con 100 µg ampicilina por ml. Las placas se incubaron 24 horas con agitación (300 rpm) en una sacudidora giratoria. Para evitar el derrame y la contaminación, y para permitir suficiente aireación, las placas se recuperaron con un lámina de cinta microporosa AirPore™ (QIAGEN GmbH, Hilden Alemania). Se aisló ADN de cada

recipiente, usando el equipo QIAprep 96 Turbo (QIAGEN GmbH, Hilden Alemania).

#### Secuenciamiento EST y Análisis de Información de Secuencia de Nucleótidos de la Biblioteca EST de *Aspergillus oryzae*

El secuenciamiento de ADN de pase simple de los ESTs de *Aspergillus oryzae* se hizo con un Secuenciador de ADN Automático Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 377 XL (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), usando química de colorante-terminador (Giesecke y otros, 1992, *Journal of Virology Methods* 38: 47 - 60) y un cebador específico pYES (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuencia de vector y secuencia 3' de baja calidad se removieron con el programa pregap del paquete Staden (MRC, Cambridge, Inglaterra). Las secuencias se montaron con software TIGR Assembler (Sutton y otros, 1995, *supra*). Las secuencias montadas se investigaron con fastx3 (véase Pearson y Lipman, 1988, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85: 2444 - 2448; Pearson, 1990, *Methods in Enzymology* 183: 63 - 98) contra una base de datos adaptada que consistía de secuencias de proteínas de SWISSPROT, SWISSPROTNEW, TREMBL, TREMBLNEW, REMTREML, PDB y GeneSeqP. La matriz utilizada fue BL50.

#### Análisis de secuencia de nucleótidos

La secuencia de nucleótidos de los clones de ADNc de lisofosfolipasa pEST204 y pEST1648 se determinó de ambas hebras por el método de terminación de cadena didesoxi (Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 74, 5463 - 5467), usando 500 ng de patrón purificado por Qiagen (Qiagen, USA), el equipo de secuenciamiento de ciclo desoxi-terminal Taq (Perkin-Elmer, USA), terminadores rotulados fluorescentes y 5 pmol de ya sea cebadores de policonector pYES2.0 (Invitrogen, USA), o cebadores de oligonucleótidos sintéticos. El análisis de la información de



secuencia se efectuó de acuerdo con Devereux y otros, 1984 (Devereux, J., Haeberli, P., y Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 387 - 395).

**Ejemplo 6: Expresión de LLPL-2 en *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger***  
Transformación en cepa de *Aspergillus*

Se inoculó a la cepa de *Aspergillus oryzae* BECh-2 y una cepa de *Aspergillus niger* con 100 ml de medio YPG, y se incubó durante 16 horas a 32 °C a 120 rpm. Los pellets se recolectaron y se lavaron con 0,6 M KCl, y se resuspendieron en 20 ml 0,6 M KCl que contenía Glucanex a la concentración de 30 µl / ml. Los cultivos se incubaron a 32 °C a 60 rpm hasta que se formaron protoplastos, luego se lavaron con buffer STC dos veces. Los protoplastos se contaron con un hematómetro y se resuspendieron en una solución 8:2:0,1 de STC : STPC : DMSO a una concentración final de  $2,5 \times 10^7$  protoplastos / ml. Aproximadamente 3 µg de ADN se agregaron a 100 µl de solución de protoplastos, se mezcló moderadamente y se incubó sobre hielo durante 30 minutos. Se agregó un ml de SPTC y se incubó 30 minutos a 37 °C. Luego de la adición de 10 ml de agarosa superior Cove a 50 °C, la reacción se volcó sobre placa de ágar Cove. Las placas de transformación se incubaron a 32 °C durante 5 días.

Expresión de gen LLPL-2 en *Aspergillus niger*

La región codificadora del gen LLPL-2 se amplificó a partir de ADN genómico de una cepa de *Aspergillus niger* por PCR, con los cebadores HU225 (SEC ID NO: 15) y HU226 (SEC ID NO: 16) que incluían un sitio enzimático de restricción BglII y un PmeI, respectivamente.

Los componentes de la reacción (1 ng / µl de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U / µl en polimerasa Taq en 1X

buffer (Roche Diagnostics, Japón)) se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min
2	92 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de 2 kb fue purificado con gel con el equipo de extracción de gel QIA, y ligado en un vector pT7Blue con elevación de ligación. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pLLPL2) se secuenció, y se confirmó que no se habían producido cambios en las secuencias de LLPL-2.

El pLLPL2 fue digerido con BglII y PmeI y ligado en los sitios BamHI y NruI en el cassette de expresión de *Aspergillus* pCaHj483 que tiene promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, secuencias líder de TPI de *Aspergillus nidulans*, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen amdS de *Aspergillus nidulans* como un marcador. El plásmido resultante fue denominado pHUda123.

El plásmido de expresión de LLPL-2, pHUda123, fue transformado en una cepa de *Aspergillus niger*. Los transformantes seleccionados se inocularon en 100 ml de medio MLC y se cultivaron a 30 °C durante 2 días. Se inocularon 5 ml de célula desarrollada en medio MLC a 100 ml de medio MU-1 y se cultivó a 30 °C durante 7 días.

El sobrenadante se obtuvo por centrifugación, y la actividad de lisofosfolipasa se midió como se describe anteriormente. La tabla a continuación muestra la actividad de lisofosfolipasa de los transformantes seleccionados, relativa a la actividad de la cepa huésped, MBin114 que fue normalizada a 1,0.

Cepa	Rendimiento (sobrenadante) Actividad relativa
MBin114	1,0
123N-33	63
123N-38	150
123N-46	157
123N-48	101

Los resultados anteriores demuestran claramente la presencia de incrementada actividad de lisofosfolipasa en sobrenadantes.

Expresión y secreción de gen LLPL-2 con delección C-terminal en *Aspergillus oryzae*

Se hizo LLPL-2 con el C-terminal deleteado (LLPL-2-CD) a partir de ADN genómico de una cepa de *A. niger*, por PCR, con los cebadores HU219 (SEC ID NO: 17) y HU244 (SEC ID NO: 18), que incluían un sitio de enzima de restricción EagI y un PmeI, respectivamente.

Los componentes de la reacción (1 ng / ml de ADN genómico, 250 mM dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U / ml en polimerasa Taq en 1X buffer (Roche Diagnostics, Japón)) se mezclaron y se sometieron para PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2 min

2	92 °C	1 min
3	55 °C	1 min
4	72 °C	1,5 min
5	72 °C	10 min
6	4 °C	siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

El fragmento de 1,3 kb fue digerido con *EagI* y *PmeI* y ligado en los sitios *EagI* y *PmeI* en el pLLPL-2 que tenía gen LLPL-2, con elevación de ligación (TOYOBO). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109. El plásmido resultante (pHUda126) se secuenció para confirmar que los nucleótidos 115 - 1824 de SEC ID NO: 3 estaban intactos, y que los nucleótidos 1825 - 1914 de SEC ID NO: 3 habían sido deletados, correspondiendo a una delección C-terminal de aminoácidos S571 - L600 de LLPL-2 (SEC ID NO: 4).

El fragmento de 2,0 kb que codifica LLPL-2-CD se obtuvo por digestión de pHUda126 con *BglII* y *SmaI*. El fragmento de 2,0 kb fue purificado por gel con el equipo de extracción de gel QIA, y ligado en los sitios *BamHI* y *NruI* en el cassette de expresión de *Aspergillus* pCaHj483 con elevación de ligación. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109.

El plásmido resultante (pHUda128) para cassette de expresión LLPL-2-CD fue construido y transformado en la cepa de *A. oryzae*, BECh-2. Los transformantes seleccionados se inocularon en 100 ml de medio MS-9 y se cultivaron a 30 °C durante 1 día. 3 ml de célula desarrollada en medio MS-9 se inocularon en 100 ml de medio MDU-pH5, y se cultivó a 30 °C durante 3 días.

El sobrenadante se obtuvo por centrifugación, y la actividad de lisofosfolipasa se midió como se describe anteriormente. La tabla muestra la actividad de lisofosfolipasa de los transformantes seleccionados, relativa a la actividad de la cepa huésped, BECh-2, que fue normalizada a 1,0.

Cepa	Rendimiento (sobrenadante) Actividad relativa
BECh-2	1,0
128-3	9
128-9	7
128-12	33
128-15	11

Los resultados anteriores demuestran claramente la presencia de incrementada actividad de lisofosfolipasa en sobrenadantes.

#### **Ejemplo 7: Uso de LLPL-2 de *A. niger* en Filtración**

Se determinó el rendimiento de filtración a 60 °C y pH 4,5, usando almidón de trigo parcialmente hidrolizado, de la siguiente manera: El hidrolizado de almidón de trigo (25 ml en un recipiente de 100 ml) se mezcló con LLPL-2 del Ejemplo 4, a una dosificación de 0,4 L / t materia seca y se incubó 6 horas a 60 °C bajo agitación magnética. Se hizo un control sin adición de enzima. Luego de 6 horas de incubación, el hidrolizado se decantó en un vidrio y se dejó reposar por espacio de 10 minutos a temperatura ambiente. La tendencia de la muestra a flocularse se determinó por inspección visual y varió como excelente, buena, regular, mala, o ninguna. El flujo de filtración posteriormente fue determinado haciendo correr la muestra a través de un filtro (Whatman no. 4) y midiendo la cantidad de filtrado luego de 2, 5 y 10 minutos. Se midió la claridad de la muestra filtrada de manera espectrofotométrica a 720 nm. El flujo del filtrado (ml) fue el siguiente:

Tiempo	Control	LLPL-2
2 min.	4	8
5 min.	8	13
10 min.	12	16

Estos resultados indican que LLPL-2 mostró un claro efecto sobre el flujo de filtración, comparado con una muestra de control. Además, se obtuvo un filtrado claro por medio del tratamiento con LLPL-2.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S  
<120> Lisofosfolipasa  
<130> 5958  
<160> 19  
<170> PatentIn versión 3.0  
<210> 1  
<211> 1923  
<212> ADN  
<213> Aspergillus niger  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (1920)  
<220>  
<221> sig\_péptido  
<222> (1) .. (63)  
<220>  
<221> mat\_péptido  
<222> (109) .. ()  
<400> 1

atg aag ttc aat gca ctc tta acg acc ctc gcg gcg ctg ggg tat atc Met Lys Phe Asn Ala Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Ile -35 -30 -25	48
caa gga ggc gcc gcg gtt cct aca acc gtc gac ctc aca tat gca gac Gln Gly Gly Ala Ala Val Pro Thr Thr Val Asp Leu Thr Tyr Ala Asp -20 -15 -10 -5	96
ata tca cct cgc gca ctg gat aat gcc cct gat ggt tat acc ccg agc Ile Ser Pro Arg Ala Leu Asp Asn Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Pro Ser -1 1 5 10	144
aat gta tcc tgt cct gca aac aga ccg acg att cgc agc gcg tca acc Asn Val Ser Cys Pro Ala Asn Arg Pro Thr Ile Arg Ser Ala Ser Thr 15 20 25	192
ctg tca tcg aac gag acg gca tgg gtg gac gtc cgg cgt aag cag act Leu Ser Ser Asn Glu Thr Ala Trp Val Asp Val Arg Arg Lys Gln Thr 30 35 40	240
gtc tca gcg atg aaa gac ctt ttc ggc cat atc aac atg agc tca ttt Val Ser Ala Met Lys Asp Leu Phe Gly His Ile Asn Met Ser Ser Phe 45 50 55 60	288
gac gct att tcg tac atc aac agc cat tca tca aat atc acc aac ata Asp Ala Ile Ser Tyr Ile Asn Ser His Ser Ser Asn Ile Thr Asn Ile 65 70 75	336
ccc aac atc ggt att gcc gtg tcc ggc ggt ggc tac aga gcc ctg acc Pro Asn Ile Gly Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Leu Thr 80 85 90	384



aac ggc gcg gga gca ctc aag gca ttc gac agt cga acg gaa aac tca Asn Gly Ala Gly Ala Leu Lys Ala Phe Asp Ser Arg Thr Glu Asn Ser 95 100 105	432
acc cat aat gga cag ctc ggt ggt ctt ctg cag tca gcc aca tac ctg Thr His Asn Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ala Thr Tyr Leu 110 115 120	480
toc ggt ctc tcc gga ggt ggc tgg ctc ctg ggc tca atc tac atc aac Ser Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp Leu Leu Gly Ser Ile Tyr Ile Asn 125 130 135 140	528
aac ttc acc acc gtc tcc aat ctg caa acc tac aaa gag ggc gaa gtc Asn Phe Thr Thr Val Ser Asn Leu Gln Thr Tyr Lys Glu Gly Glu Val 145 150 155	576
tgg cag ttc cag aat tca atc acg aaa ggc cca aag acc aac ggc ttg Trp Gln Phe Gln Asn Ser Ile Thr Lys Gly Pro Lys Thr Asn Gly Leu 160 165 170	624
caa gct tgg gat aca gcc aag tac tac cgc gat ctg gcc aag gtg gtc Gln Ala Trp Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Arg Asp Leu Ala Lys Val Val 175 180 185	672
gct ggc aag aag gac gcg ggc ttc aac act tcc ttc acg gac tac tgg Ala Gly Lys Lys Asp Ala Gly Phe Asn Thr Ser Phe Thr Asp Tyr Trp 190 195 200	720
ggt cgc gca ctc tcc tac cag ctg att aac gcg acc gac gga ggc cca Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu Ile Asn Ala Thr Asp Gly Gly Pro 205 210 215 220	768
ggc tac acc tgg tca tcg atc gct tta acc cag ggc ttc aag aac gga Gly Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Thr Gln Gly Phe Lys Asn Gly 225 230 235	816
aac atg ccc atg ccg ctc ctt gtc gcc gac ggc cgc aac cca ggc gag Asn Met Pro Met Pro Leu Leu Val Ala Asp Gly Arg Asn Pro Gly Glu 240 245 250	864
acc cta atc ggc agc aac tcg acc gtg tat gag ttc aac ccc tgg gaa Thr Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe Asn Pro Trp Glu 255 260 265	912
ttc ggc agt ttt gat ccg tcc atc ttc ggc ttc gct ccc ctc gaa tac Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Ile Phe Gly Phe Ala Pro Leu Glu Tyr 270 275 280	960
ctc gga tcc tac ttt gag aac ggc gaa gtc cca tcc agc cga tcc tgc Leu Gly Ser Tyr Phe Glu Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Arg Ser Cys 285 290 295 300	1008
gtc cgc ggc ttc gat aac gca ggc ttc gtc atg gga acc tcc tcc agt Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr Ser Ser Ser 305 310 315	1056
ctc ttc aac caa ttc atc ctg aag ctc aac acc acc gac atc cca tca Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Lys Leu Asn Thr Thr Asp Ile Pro Ser 320 325 330	1104

acc ctc aaa acg gtc atc gcc agc atc cta gaa gaa cta ggc gac cgc 1152  
 Thr Leu Lys Thr Val Ile Ala Ser Ile Leu Glu Glu Leu Gly Asp Arg  
 335 340 345

aac gac gac atc gcc atc tac tct ccc aac ccc ttc tac ggg tac cgc 1200  
 Asn Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Ser Pro Asn Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg  
 350 355 360

aac gcg aca gtt tca tac gaa aag acc ccg gac ctg aac gtc gtc gac 1248  
 Asn Ala Thr Val Ser Tyr Glu Lys Thr Pro Asp Leu Asn Val Val Asp  
 365 370 375 380

ggc ggc gaa gac aaa cag aac ctc ccc ctc cat cct ctc atc caa ccc 1296  
 Gly Gly Glu Asp Lys Gln Asn Leu Pro Leu His Pro Leu Ile Gln Pro  
 385 390 395

gcc cgc aac gtg gac gtc atc ttc gcc gtc gac tcc tca gcc agt acc 1344  
 Ala Arg Asn Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser Ala Ser Thr  
 400 405 410

tcg gac aac tgg ccc aac gga agt cct ctc gtc gcg act tac gaa cgt 1392  
 Ser Asp Asn Trp Pro Asn Gly Ser Pro Leu Val Ala Thr Tyr Glu Arg  
 415 420 425

agt ctc aac tca acc ggt atc gga aac ggc acc gcg ttc cct agc atc 1440  
 Ser Leu Asn Ser Thr Gly Ile Gly Asn Gly Thr Ala Phe Pro Ser Ile  
 430 435 440

ccg gac aag agc acc ttc att aac ctg ggc ttg aac acc cgt ccg act 1498  
 Pro Asp Lys Ser Thr Phe Ile Asn Leu Gly Leu Asn Thr Arg Pro Thr  
 445 450 455 460

ttc ttc ggc tgc aat agt tcc aat atc aca ggc cat gca ccc ctg gtt 1536  
 Phe Phe Gly Cys Asn Ser Ser Asn Ile Thr Gly His Ala Pro Leu Val  
 465 470 475

gtc tac ctc ccc aac tac ccc tac aca acc ctc tcc aac aag tcg acc 1584  
 Val Tyr Leu Pro Asn Tyr Pro Tyr Thr Thr Leu Ser Asn Lys Ser Thr  
 480 485 490

ttc cag ctc aag tac gag atc ttg gag cgt gat gag atg atc acc aat 1632  
 Phe Gln Leu Lys Tyr Glu Ile Leu Glu Arg Asp Glu Met Ile Thr Asn  
 495 500 505

ggc tgg aac gtg gtt act atg ggt aat gga tca agg aag tct tac gag 1680  
 Gly Trp Asn Val Val Thr Met Gly Asn Gly Ser Arg Lys Ser Tyr Glu  
 510 515 520

gat tgg ccg act tgt gcg ggc tgc gct att ctg agt cgc tcg ttt gat 1728  
 Asp Trp Pro Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ile Leu Ser Arg Ser Phe Asp  
 525 530 535 540

ccg act aat acc cag gtg ccg gat atg tgc tcg cag tgt ttt gac aag 1776  
 Arg Thr Asn Thr Gln Val Pro Asp Met Cys Ser Gln Cys Phe Asp Lys  
 545 550 555

tat tgc tgg gat gga acg agg aat agt acg acg ccg gcg gcg tat gag 1824  
 Tyr Cys Trp Asp Gly Thr Arg Asn Ser Thr Thr Pro Ala Ala Tyr Glu  
 560 565 570

ccg aag gta ttg atg gct agt gcg ggt gtg ags ggt att tcg atg tcg 1872

Pro Lys Val Leu Met Ala Ser Ala Gly Val Arg Gly Ile Ser Met Ser  
 575 580 585

agg ttg gtt ttg ggt ctc ttt ccg gtg gtg gtt ggg gtt tgg atg atg 1920  
 Arg Leu Val Leu Gly Leu Phe Pro Val Val Val Gly Val Trp Met Met  
 590 595 600

tga 1923

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 640

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Aspergillus niger

&lt;400&gt; 2

Met Lys Phe Asn Ala Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Ile  
 -35 -30 -25

Gln Gly Gly Ala Ala Val Pro Thr Thr Val Asp Leu Thr Tyr Ala Asp  
 -20 -15 -10 -5

Ile Ser Pro Arg Ala Leu Asp Asn Ala Pro Asp Gly Tyr Thr Pro Ser  
 -1 1 5 10

Asn Val Ser Cys Pro Ala Asn Arg Pro Thr Ile Arg Ser Ala Ser Thr  
 15 20 25

Leu Ser Ser Asn Glu Thr Ala Trp Val Asp Val Arg Arg Lys Gln Thr  
 30 35 40

Val Ser Ala Met Lys Asp Leu Phe Gly His Ile Asn Met Ser Ser Phe  
 45 50 55 60

Asp Ala Ile Ser Tyr Ile Asn Ser His Ser Ser Asn Ile Thr Asn Ile  
 65 70 75

Pro Asn Ile Gly Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Leu Thr  
 80 85 90

Asn Gly Ala Gly Ala Leu Lys Ala Phe Asp Ser Arg Thr Glu Asn Ser  
 95 100 105

Thr His Asn Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ala Thr Tyr Leu  
 110 115 120

Ser Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp Leu Leu Gly Ser Ile Tyr Ile Asn  
 125 130 135 140

Asn Phe Thr Thr Val Ser Asn Leu Gln Thr Tyr Lys Glu Gly Glu Val  
 145 150 155  
 Trp Gln Phe Gln Asn Ser Ile Thr Lys Gly Pro Lys Thr Asn Gly Leu  
 160 165 170  
 Gln Ala Trp Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Arg Asp Leu Ala Lys Val Val  
 175 180 185  
 Ala Gly Lys Lys Asp Ala Gly Phe Asn Thr Ser Phe Thr Asp Tyr Trp  
 190 195 200  
 Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu Ile Asn Ala Thr Asp Gly Gly Pro  
 205 210 215 220  
 Gly Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Thr Gln Gly Phe Lys Asn Gly  
 225 230 235  
 Asn Met Pro Met Pro Leu Leu Val Ala Asp Gly Arg Asn Pro Gly Glu  
 240 245 250  
 Thr Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe Asn Pro Trp Glu  
 255 260 265  
 Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Ile Phe Gly Phe Ala Pro Leu Glu Tyr  
 270 275 280  
 Leu Gly Ser Tyr Phe Glu Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Arg Ser Cys  
 285 290 295 300  
 Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr Ser Ser Ser  
 305 310 315  
 Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Lys Leu Asn Thr Thr Asp Ile Pro Ser  
 320 325 330  
 Thr Leu Lys Thr Val Ile Ala Ser Ile Leu Glu Glu Leu Gly Asp Arg  
 335 340 345  
 Asn Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Ser Pro Asn Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg  
 350 355 360  
 Asn Ala Thr Val Ser Tyr Glu Lys Thr Pro Asp Leu Asn Val Val Asp  
 365 370 375 380  
 Gly Gly Glu Asp Lys Gln Asn Leu Pro Leu His Pro Leu Ile Gln Pro

385                      390                      395  
 Ala Arg Asn Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser Ala Ser Thr  
                     400                      405                      410  
 Ser Asp Asn Trp Pro Asn Gly Ser Pro Leu Val Ala Thr Tyr Glu Arg  
                     415                      420                      425  
 Ser Leu Asn Ser Thr Gly Ile Gly Asn Gly Thr Ala Phe Pro Ser Ile  
                     430                      435                      440  
 Pro Asp Lys Ser Thr Phe Ile Asn Leu Gly Leu Asn Thr Arg Pro Thr  
                     445                      450                      455                      460  
 Phe Phe Gly Cys Asn Ser Ser Asn Ile Thr Gly His Ala Pro Leu Val  
                     465                      470                      475  
 Val Tyr Leu Pro Asn Tyr Pro Tyr Thr Thr Leu Ser Asn Lys Ser Thr  
                     480                      485                      490  
 Phe Gln Leu Lys Tyr Glu Ile Leu Glu Arg Asp Glu Met Ile Thr Asn  
                     495                      500                      505  
 Gly Trp Asn Val Val Thr Met Gly Asn Gly Ser Arg Lys Ser Tyr Glu  
                     510                      515                      520  
 Asp Trp Pro Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ile Leu Ser Arg Ser Phe Asp  
                     525                      530                      535                      540  
 Arg Thr Asn Thr Gln Val Pro Asp Met Cys Ser Gln Cys Phe Asp Lys  
                     545                      550                      555  
 Tyr Cys Trp Asp Gly Thr Arg Asn Ser Thr Thr Pro Ala Ala Tyr Glu  
                     560                      565                      570  
 Pro Lys Val Leu Met Ala Ser Ala Gly Val Arg Gly Ile Ser Met Ser  
                     575                      580                      585  
 Arg Leu Val Leu Gly Leu Phe Pro Val Val Val Gly Val Trp Met Met  
                     590                      595                      600

<210> 3

<211> 1917

<212> ADN

<213> *Aspergillus niger*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1914)

<220>

<221> mat\_péptido

<222> (115) .. ()

<400> 3

atg aag ttg cct ctc ttt gct gct gca gca gct ggc ctc gcc aat gcc	48
Met Lys Leu Pro Leu Phe Ala Ala Ala Gly Leu Ala Asn Ala	
-35 -30 -25	
gct tcc ctg cct gtc gaa agg gcc gag gct gag gtt gcg tcc gtc gcc	96
Ala Ser Leu Pro Val Glu Arg Ala Glu Ala Glu Val Ala Ser Val Ala	
-20 -15 -10	
gcc gat tta atc gtc cgc gcc ctc ccc aat gcc ccc gat ggc tac act	144
Ala Asp Leu Ile Val Arg Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asp Gly Tyr Thr	
-5 -1 1 5 10	
ccc tcc aat gtc acc tgt ccc tgg act cgt cgg agc att cgt gat gcc	192
Pro Ser Asn Val Thr Cys Pro Ser Thr Arg Pro Ser Ile Arg Asp Ala	
15 20 25	
tgg ggc atc tcc acc aac gag acc gag tgg ctc aag gtc cgt cgc aat	240
Ser Gly Ile Ser Thr Asn Glu Thr Glu Trp Leu Lys Val Arg Arg Asn	
30 35 40	
gcg acc ctc acc ccg atg aag aac ctc ctt agc cgt ctc aac ctc acc	288
Ala Thr Leu Thr Pro Met Lys Asn Leu Leu Ser Arg Leu Asn Leu Thr	
45 50 55	
ggc ttt gat acc acc tcc tac atc aat gaa cac tcc agc aac att tcc	336
Gly Phe Asp Thr Thr Ser Tyr Ile Asn Glu His Ser Ser Asn Ile Ser	
60 65 70	
aac atc ccc aac att gca att gcg gct tgg ggt ggt gga tac cgt gcg	384
Asn Ile Pro Asn Ile Ala Ile Ala Ala Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala	
75 80 85 90	
ctc acc aac gga gct ggt gcg ctg aag gct ttc gac agc cgc tcc gac	432
Leu Thr Asn Gly Ala Gly Ala Leu Lys Ala Phe Asp Ser Arg Ser Asp	
95 100 105	
aat gcc acc aac tcc ggt caa ctg ggt ggt ctg ctg cag gcg gca acc	480
Asn Ala Thr Asn Ser Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ala Ala Thr	
110 115 120	
tac gtc tct ggt ctg agt ggt ggt agc tgg ctg gtc gga tcc atg ttc	528
Tyr Val Ser Gly Leu Ser Gly Gly Ser Trp Leu Val Gly Ser Met Phe	
125 130 135	
gtc aac aac ttc tcc tcc atc ggt gaa ttg caa gcc agc gag aag gtc	576
Val Asn Asn Phe Ser Ser Ile Gly Glu Leu Gln Ala Ser Glu Lys Val	
140 145 150	
tgg cgc ttc gac aag tcc ctg ctc gag gga ccc aac ttc gac cac atc	624
Trp Arg Phe Asp Lys Ser Leu Leu Glu Gly Pro Asn Phe Asp His Ile	
155 160 165 170	
cag atc gtc agc acg gtg gaa tac tgg aag gac att acc gag gaa gtc	672

Gln Ile Val Ser Thr Val Glu Tyr Trp Lys Asp Ile Thr Glu Glu Val  
 175 180 185

gag ggc aag gct aac gct ggt ttt aac act tcc ttc acc gac tac tgg 720  
 Asp Gly Lys Ala Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Phe Thr Asp Tyr Trp  
 190 195 200

ggc cgt gcg ctg tcc tac cag ctg gtg aac gcc tcc gat gac aag ggt 768  
 Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu Val Asn Ala Ser Asp Asp Lys Gly  
 205 210 215

ggt ccc gac tac acc tgg tcc tcc att gcg ctc atg gac gac ttc aag 816  
 Gly Pro Asp Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Met Asp Asp Phe Lys  
 220 225 230

aac ggc cag tac ccc atg cct att gtg gtc gcc gac ggc cgc aac ccc 864  
 Asn Gly Gln Tyr Pro Met Pro Ile Val Val Ala Asp Gly Arg Asn Pro  
 235 240 245 250

ggc gaa atc atc gtt gag acc aat gcc acc gtt tat gaa gtg aac cct 912  
 Gly Glu Ile Ile Val Glu Thr Asn Ala Thr Val Tyr Glu Val Asn Pro  
 255 260 265

tgg gaa ttc ggc tct ttc gac ccc agc gtc tac gcc ttc got ccc ctg 960  
 Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Val Tyr Ala Phe Ala Pro Leu  
 270 275 280

cag tat ctg ggc tcc cgs ttc gag aac ggc tcc atc ccg gac aac ggc 1008  
 Gln Tyr Leu Gly Ser Arg Phe Glu Asn Gly Ser Ile Pro Asp Asn Gly  
 285 290 295

acc tgc gtg agc ggc ttc gac aat gcc ggc ttt atc atg gga tca tcc 1056  
 Thr Cys Val Ser Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Ile Met Gly Ser Ser  
 300 305 310

tcc acc ctg ttc aac caa ttc ctc ctc caa atc aac agc acc agc atc 1104  
 Ser Thr Leu Phe Asn Gln Phe Leu Leu Gln Ile Asn Ser Thr Ser Ile  
 315 320 325 330

ccc acg atc ctg aag gat gcc ttc act gac atc ctc gag gac ctc ggt 1152  
 Pro Thr Ile Leu Lys Asp Ala Phe Thr Asp Ile Leu Glu Asp Leu Gly  
 335 340 345

gag cgc aac gac gat atc gcc gtc tac tcc ccc aac ccc ttc tcc ggc 1200  
 Glu Arg Asn Asp Asp Ile Ala Val Tyr Ser Pro Asn Pro Phe Ser Gly  
 350 355 360

tac cgc gac agc agc gag gat tac gcc aca gcc aag gac ctc gac gtt 1248  
 Tyr Arg Asp Ser Ser Glu Asp Tyr Ala Thr Ala Lys Asp Leu Asp Val  
 365 370 375

gtc gac ggt ggt gaa gac ggc gag aac atc cct ctg cac ccg ctg atc 1296  
 Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Glu Asn Ile Pro Leu His Pro Leu Ile  
 380 385 390

cag ccc gag cgt gcc gtc gat gtc atc ttc gcc atc gac tcc tct gcc 1344  
 Gln Pro Glu Arg Ala Val Asp Val Ile Phe Ala Ile Asp Ser Ser Ala  
 395 400 405 410

gag aca gac tac tac tgg ccc aac ggt acc tcc ctt gtc gcg acc tac 1392  
 Asp Thr Asp Tyr Tyr Trp Pro Asn Gly Thr Ser Leu Val Ala Thr Tyr



415	420	425	
gag cgc agt ctc gag ccc ago atc gcc aac ggc acc gcc ttc ccc gcc			1440
Glu Arg Ser Leu Glu Pro Ser Ile Ala Asn Gly Thr Ala Phe Pro Ala			
430	435	440	
gtg ccg gat cag aac acc ttc gtc aac ctg ggt ctc aac tcc cgc ccg			1488
Val Pro Asp Gln Asn Thr Phe Val Asn Leu Gly Leu Asn Ser Arg Pro			
445	450	455	
act ttc ttc ggc tgc gac ccc aag aac atc tcc ggc acc gcc ccc ctg			1536
Thr Phe Phe Gly Cys Asp Pro Lys Asn Ile Ser Gly Thr Ala Pro Leu			
460	465	470	
gtc att tat ctg cct aac agc ccc tac acc tac gac tcc aac ttc tgg			1584
Val Ile Tyr Leu Pro Asn Ser Pro Tyr Thr Tyr Asp Ser Asn Phe Ser			
475	480	485	490
acc ttc aag ctg acc tac agc gac gag gag cgt gat tcc gtc atc acc			1632
Thr Phe Lys Leu Thr Tyr Ser Asp Glu Glu Arg Asp Ser Val Ile Thr			
495	500	505	
aac ggc tgg aac gtg gtc act cgc ggt aac ggt acc gtt gat gat aac			1680
Asn Gly Trp Asn Val Val Thr Arg Gly Asn Gly Thr Val Asp Asp Asn			
510	515	520	
ttc ccg tct tgc gtg gcg tgc gct att ctc caa gcg ctc cac tac agg			1728
Phe Pro Ser Cys Val Ala Cys Ala Ile Leu Gln Ala Leu His Tyr Arg			
525	530	535	
acg aac acc tct ctg cca gat atc tgt acc acc tgc ttt aac gat tac			1776
Thr Asn Thr Ser Leu Pro Asp Ile Cys Thr Thr Cys Phe Asn Asp Tyr			
540	545	550	
tgc tgg aac ggc acg aca aac agc act acg cct gga gct tat gaa ccc			1824
Cys Trp Asn Gly Thr Thr Asn Ser Thr Thr Pro Gly Ala Tyr Glu Pro			
555	560	565	570
agt gtg ctg att gct act agc ggt gcg atc aag agt gtc ttg gat tac			1872
Ser Val Leu Ile Ala Thr Ser Gly Ala Ile Lys Ser Val Leu Asp Tyr			
575	580	585	
tgg gtg ctg gcg ctc gcc atg ggt gtt gct gcg ttt atg ctg tag			1917
Ser Val Leu Ala Leu Ala Met Gly Val Ala Ala Phe Met Leu			
590	595	600	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 638

&lt;212&gt; PRT

<213> *Aspergillus niger*

&lt;400&gt; 4

Ala Asp Leu Ile Val Arg Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asp Gly Tyr Thr  
 -5 -1 1 5 10

Pro Ser Asn Val Thr Cys Pro Ser Thr Arg Pro Ser Ile Arg Asp Ala  
 15 20 25

Ser Gly Ile Ser Thr Asn Glu Thr Glu Trp Leu Lys Val Arg Arg Asn  
 30 35 40

Ala Thr Leu Thr Pro Met Lys Asn Leu Leu Ser Arg Leu Asn Leu Thr  
 45 50 55

Gly Phe Asp Thr Thr Ser Tyr Ile Asn Glu His Ser Ser Asn Ile Ser  
 60 65 70

Asn Ile Pro Asn Ile Ala Ile Ala Ala Ser Gly Gly Tyr Arg Ala  
 75 80 85 90

Leu Thr Asn Gly Ala Gly Ala Leu Lys Ala Phe Asp Ser Arg Ser Asp  
 95 100 105

Asn Ala Thr Asn Ser Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ala Ala Thr  
 110 115 120

Tyr Val Ser Gly Leu Ser Gly Gly Ser Trp Leu Val Gly Ser Met Phe  
 125 130 135

Val Asn Asn Phe Ser Ser Ile Gly Glu Leu Gln Ala Ser Glu Lys Val  
 140 145 150

Trp Arg Phe Asp Lys Ser Leu Leu Glu Gly Pro Asn Phe Asp His Ile  
 155 160 165 170

Gln Ile Val Ser Thr Val Glu Tyr Trp Lys Asp Ile Thr Glu Glu Val  
 175 180 185

Asp Gly Lys Ala Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Phe Thr Asp Tyr Trp  
 190 195 200

Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu Val Asn Ala Ser Asp Asp Lys Gly  
 205 210 215

Gly Pro Asp Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Met Asp Asp Phe Lys  
 220 225 230

Asn Gly Gln Tyr Pro Met Pro Ile Val Val Ala Asp Gly Arg Asn Pro  
 235 240 245 250

Gly Glu Ile Ile Val Glu Thr Asn Ala Thr Val Tyr Glu Val Asn Pro  
 255 260 265

Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Val Tyr Ala Phe Ala Pro Leu  
 270 275 280

Gln Tyr Leu Gly Ser Arg Phe Glu Asn Gly Ser Ile Pro Asp Asn Gly  
 285 290 295

Thr Cys Val Ser Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Ile Met Gly Ser Ser  
 300 305 310

Ser Thr Leu Phe Asn Gln Phe Leu Leu Gln Ile Asn Ser Thr Ser Ile  
 315 320 325 330

Pro Thr Ile Leu Lys Asp Ala Phe Thr Asp Ile Leu Glu Asp Leu Gly  
 335 340 345

Glu Arg Asn Asp Asp Ile Ala Val Tyr Ser Pro Asn Pro Phe Ser Gly  
 350 355 360

Tyr Arg Asp Ser Ser Glu Asp Tyr Ala Thr Ala Lys Asp Leu Asp Val  
 365 370 375

Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Glu Asn Ile Pro Leu His Pro Leu Ile  
 380 385 390

Gln Pro Glu Arg Ala Val Asp Val Ile Phe Ala Ile Asp Ser Ser Ala  
 395 400 405 410

Asp Thr Asp Tyr Tyr Trp Pro Asn Gly Thr Ser Leu Val Ala Thr Tyr  
 415 420 425

Glu Arg Ser Leu Glu Pro Ser Ile Ala Asn Gly Thr Ala Phe Pro Ala  
 430 435 440

Val Pro Asp Gln Asn Thr Phe Val Asn Leu Gly Leu Asn Ser Arg Pro  
 445 450 455

Thr Phe Phe Gly Cys Asp Pro Lys Asn Ile Ser Gly Thr Ala Pro Leu  
 460 465 470

Val Ile Tyr Leu Pro Asn Ser Pro Tyr Thr Tyr Asp Ser Asn Phe Ser

475

480

485

490

Thr Phe Lys Leu Thr Tyr Ser Asp Glu Glu Arg Asp Ser Val Ile Thr  
 495 500 505

Asn Gly Trp Asn Val Val Thr Arg Gly Asn Gly Thr Val Asp Asp Asn  
 510 515 520

Phe Pro Ser Cys Val Ala Cys Ala Ile Leu Gln Ala Leu His Tyr Arg  
 525 530 535

Thr Asn Thr Ser Leu Pro Asp Ile Cys Thr Thr Cys Phe Asn Asp Tyr  
 540 545 550

Cys Trp Asn Gly Thr Thr Asn Ser Thr Thr Pro Gly Ala Tyr Glu Pro  
 555 560 565 570

Ser Val Leu Ile Ala Thr Ser Gly Ala Ile Lys Ser Val Leu Asp Tyr  
 575 580 585

Ser Val Leu Ala Leu Ala Met Gly Val Ala Ala Phe Met Leu  
 590 595 600

<210> 5

<211> 1884

<212> ADN

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1881)

<220>

<221> sig\_péptido

<222> (1) .. (45)

<220>

<221> mat\_péptido

<222> (70) .. ()

<400> 5

```

atg aag gtc gcc ctg ctc acc tta gca gcg ggc ttg gcc aat gcc gcc      48
Met Lys Val Ala Leu Leu Thr Leu Ala Ala Gly Leu Ala Asn Ala Ala
      -20              -15              -10

tcg atc gcc gtc act cca cgg gcg ttc ccc aat gcc cct gat aaa tat      96
Ser Ile Ala Val Thr Pro Arg Ala Phe Pro Asn Ala Pro Asp Lys Tyr
      -5              -1 1              5

gct ccc gca aat gtt tcc tgt ccg tcy act cgt ccc agt atc cgc agt      144
Ala Pro Ala Asn Val Ser Cys Pro Ser Thr Arg Pro Ser Ile Arg Ser
10              15              20              25

```

gcc gcc gcc ctg tcc acc agt gag aag gat tgg ttg caa gtg cgt cgg 192  
 Ala Ala Ala Leu Ser Thr Ser Glu Lys Asp Trp Leu Gln Val Arg Arg  
 30 35 40

aat gag acc ctt gaa ccc atg aag gat ttg ctc ggg cgg ctc aat cta 240  
 Asn Glu Thr Leu Glu Pro Met Lys Asp Leu Leu Gly Arg Leu Asn Leu  
 45 50 55

agc tcc ttt gat gcc tcg ggg tac att gac cgt cat aaa aac aat gca 288  
 Ser Ser Phe Asp Ala Ser Gly Tyr Ile Asp Arg His Lys Asn Asn Ala  
 60 65 70

tcg aat att cca aac gtg gcc att gcc gtt tca ggt ggt ggt tac cgc 336  
 Ser Asn Ile Pro Asn Val Ala Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg  
 75 80 85

gct ttg acc aat ggc gcg ggt gct atc aag gca ttc gat agt cgt acc 384  
 Ala Leu Thr Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala Phe Asp Ser Arg Thr  
 90 95 100 105

tcc aac tcc aca gcc cgt gga cag ctc gga ggc ctt ctg cag tcc tot 432  
 Ser Asn Ser Thr Ala Arg Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ser  
 110 115 120

act tat cta tcg ggc ctc agt ggt ggt gga tgg ctc gtg ggc tcc gtg 480  
 Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Ser Gly Gly Trp Leu Val Gly Ser Val  
 125 130 135

tac atc aac aac ttc acc act atc ggt gac ctg cag gcc agc gac aag 528  
 Tyr Ile Asn Asn Phe Thr Thr Ile Gly Asp Leu Gln Ala Ser Asp Lys  
 140 145 150

gtc tgg gac ttc aag aac tct att ctg gag ggt cct gat gtt aaa cat 576  
 Val Trp Asp Phe Lys Asn Ser Ile Leu Glu Gly Pro Asp Val Lys His  
 155 160 165

ttc caa ctg atc aac act gcc gcg tac tgg aag gat ctg tac gat gcg 624  
 Phe Gln Leu Ile Asn Thr Ala Ala Tyr Trp Lys Asp Leu Tyr Asp Ala  
 170 175 180 185

gtg aag gat aag aga aac gcc ggg ttc aac act tcg ttg acc gac tac 672  
 Val Lys Asp Lys Arg Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Leu Thr Asp Tyr  
 190 195 200

tgg ggc cgt gct ctc tcc tat cag ttc atc aac gct acc act gat gat 720  
 Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Phe Ile Asn Ala Thr Thr Asp Asp  
 205 210 215

ggc ggt ccc agt tat acc tgg tcg tcg att gcc ttg ggc gac gat ttc 768  
 Gly Gly Pro Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Gly Asp Asp Phe  
 220 225 230

aag aag ggc aag atg ccc atg cct atc ctc gtc gcc gat gga cgt aac 816  
 Lys Lys Gly Lys Met Pro Met Pro Ile Leu Val Ala Asp Gly Arg Asn  
 235 240 245

ccg ggc gaa ata ctt att gga agt aac tcg act gtg tat gaa ttt aac 864  
 Pro Gly Glu Ile Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe Asn  
 250 255 260 265

cca tgg gag ttc ggc tcc ttc gac ccg tca gta tac ggc ttt gca cca 912

Pro Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Val Tyr Gly Phe Ala Pro	
270 275 280	
ttg gag tat ctt gga tcc aat ttc gag aac ggt gaa ctc ccc aag ggg	960
Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Asn Phe Glu Asn Gly Glu Leu Pro Lys Gly	
285 290 295	
gaa tcg tgc gtg cgc ggc ttt gac aat gcg ggt ttt gtc atg ggt acc	1008
Glu Ser Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr	
300 305 310	
agc tct tcc ctg ttt aac cag ttc att ctg cgt ctg aac ggc acc gat	1056
Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Arg Leu Asn Gly Thr Asp	
315 320 325	
atc cct aat ttc ctc aag gag gcg att gcc gat gtc ttg gaa cat ctg	1104
Ile Pro Asn Phe Leu Lys Glu Ala Ile Ala Asp Val Leu Glu His Leu	
330 335 340 345	
ggc gaa aac gat gag gac att gca gtt tac gca ccc aac ccc ttc tac	1152
Gly Glu Asn Asp Glu Asp Ile Ala Val Tyr Ala Pro Asn Pro Phe Tyr	
350 355 360	
aaa tat cgc aat tca acg gca gca tat tcg tca acc cca gag ctg gac	1200
Lys Tyr Arg Asn Ser Thr Ala Ala Tyr Ser Ser Thr Pro Glu Leu Asp	
365 370 375	
gtg gtc gac gga ggt gaa gat gga cag aac gtg cct cta cac ccg ttg	1248
Val Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Gln Asn Val Pro Leu His Pro Leu	
380 385 390	
atc cag ccc acc cac aac gtg gat gtg atc ttt gcc gtg gat tcg tcc	1296
Ile Gln Pro Thr His Asn Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser	
395 400 405	
gct gat acg gac cat agc tgg ccc aac gga tcc tcc ttg atc tac acc	1344
Ala Asp Thr Asp His Ser Trp Pro Asn Gly Ser Ser Leu Ile Tyr Thr	
410 415 420 425	
tat gaa cgt agc ttg aat act aca ggt atc gcc aac ggg acc tcc ttc	1392
Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Thr Thr Gly Ile Ala Asn Gly Thr Ser Phe	
430 435 440	
cct gcg gtg ccc gac gtc aac acg ttc ctc aac ctt ggc ctg aac aaa	1440
Pro Ala Val Pro Asp Val Asn Thr Phe Leu Asn Leu Gly Leu Asn Lys	
445 450 455	
cgc ccg acc ttc ttc gga tgc aat tca tcc aac acc agc acc ccg acc	1488
Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asn Ser Ser Asn Thr Ser Thr Pro Thr	
460 465 470	
cca ttg att gtc tac ttg ccc aac gcc cct tac acc gcc gag tcc aac	1536
Pro Leu Ile Val Tyr Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Thr Ala Glu Ser Asn	
475 480 485	
acg tca acc ttc cag ctg gcg tat aag gac caa caa cgc gat gat att	1584
Thr Ser Thr Phe Gln Leu Ala Tyr Lys Asp Gln Gln Arg Asp Asp Ile	
490 495 500 505	
atc ttg aac ggc tac aac gtc gtc acc cag ggc aat gcc agt gcc gat	1632
Ile Leu Asn Gly Tyr Asn Val Val Thr Gln Gly Asn Ala Ser Ala Asp	

510	515	520	
gca aac tgg ccc tgc tgc gtt ggg tgc gct att ctc cag cgg tcc acc			1680
Ala Asn Trp Pro Ser Cys Val Gly Cys Ala Ile Leu Gln Arg Ser Thr			
525	530	535	
gaa cgt acg aac act aag ctt ccc gat atc tgc aat acc tgc ttc aag			1728
Glu Arg Thr Asn Thr Lys Leu Pro Asp Ile Cys Asn Thr Cys Phe Lys			
540	545	550	
aat tac tgc tgg gac gga aag acc aac agc acc aca ccg gct ccc tat			1776
Asn Tyr Cys Trp Asp Gly Lys Thr Asn Ser Thr Thr Pro Ala Pro Tyr			
555	560	565	
gaa ccg gag cta ttg atg gag gcg tgc act tcc ggg gcc tgc aag gat			1824
Glu Pro Glu Leu Leu Met Glu Ala Ser Thr Ser Gly Ala Ser Lys Asp			
570	575	580	585
caa ctg aac cgg aca gct gca gtc atc gcg ttc gca gtt atg ttc ttc			1872
Gln Leu Asn Arg Thr Ala Ala Val Ile Ala Phe Ala Val Met Phe Phe			
590	595	600	
atg acg atc tag			1884
Met Thr Ile			



&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 627

&lt;212&gt; PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

&lt;400&gt; 6

Met Lys Val Ala Leu Leu Thr Leu Ala Ala Gly Leu Ala Asn Ala Ala  
 -20 -15 -10

Ser Ile Ala Val Thr Pro Arg Ala Phe Pro Asn Ala Pro Asp Lys Tyr  
 -5 -1 1 5

Ala Pro Ala Asn Val Ser Cys Pro Ser Thr Arg Pro Ser Ile Arg Ser  
 10 15 20 25

Ala Ala Ala Leu Ser Thr Ser Glu Lys Asp Trp Leu Gln Val Arg Arg  
 30 35 40

Asn Glu Thr Leu Glu Pro Met Lys Asp Leu Leu Gly Arg Leu Asn Leu  
 45 50 55

Ser Ser Phe Asp Ala Ser Gly Tyr Ile Asp Arg His Lys Asn Asn Ala  
 60 65 70

Ser Asn Ile Pro Asn Val Ala Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg  
 75 80 85

Ala Leu Thr Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala Phe Asp Ser Arg Thr  
 90 95 100 105  
 Ser Asn Ser Thr Ala Arg Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ser  
 110 115 120  
 Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp Leu Val Gly Ser Val  
 125 130 135  
 Tyr Ile Asn Asn Phe Thr Thr Ile Gly Asp Leu Gln Ala Ser Asp Lys  
 140 145 150  
 Val Trp Asp Phe Lys Asn Ser Ile Leu Glu Gly Pro Asp Val Lys His  
 155 160 165  
 Phe Gln Leu Ile Asn Thr Ala Ala Tyr Trp Lys Asp Leu Tyr Asp Ala  
 170 175 180 185  
 Val Lys Asp Lys Arg Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Leu Thr Asp Tyr  
 190 195 200  
 Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Phe Ile Asn Ala Thr Thr Asp Asp  
 205 210 215  
 Gly Gly Pro Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Gly Asp Asp Phe  
 220 225 230  
 Lys Lys Gly Lys Met Pro Met Pro Ile Leu Val Ala Asp Gly Arg Asn  
 235 240 245  
 Pro Gly Glu Ile Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe Asn  
 250 255 260 265  
 Pro Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Val Tyr Gly Phe Ala Pro  
 270 275 280  
 Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Asn Phe Glu Asn Gly Glu Leu Pro Lys Gly  
 285 290 295  
 Glu Ser Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr  
 300 305 310  
 Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Arg Leu Asn Gly Thr Asp  
 315 320 325

Ile Pro Asn Phe Leu Lys Glu Ala Ile Ala Asp Val Leu Glu His Leu  
330 335 340 345

Gly Glu Asn Asp Glu Asp Ile Ala Val Tyr Ala Pro Asn Pro Phe Tyr  
350 355 360

Lys Tyr Arg Asn Ser Thr Ala Ala Tyr Ser Ser Thr Pro Glu Leu Asp  
365 370 375

Val Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Gln Asn Val Pro Leu His Pro Leu  
380 385 390

Ile Gln Pro Thr His Asn Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser  
395 400 405

Ala Asp Thr Asp His Ser Trp Pro Asn Gly Ser Ser Leu Ile Tyr Thr  
410 415 420 425

Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Thr Thr Gly Ile Ala Asn Gly Thr Ser Phe  
430 435 440

Pro Ala Val Pro Asp Val Asn Thr Phe Leu Asn Leu Gly Leu Asn Lys  
445 450 455

Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asn Ser Ser Asn Thr Ser Thr Pro Thr  
460 465 470

Pro Leu Ile Val Tyr Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Thr Ala Glu Ser Asn  
475 480 485

Thr Ser Thr Phe Gln Leu Ala Tyr Lys Asp Gln Gln Arg Asp Asp Ile  
490 495 500 505

Ile Leu Asn Gly Tyr Asn Val Val Thr Gln Gly Asn Ala Ser Ala Asp  
510 515 520

Ala Asn Trp Pro Ser Cys Val Gly Cys Ala Ile Leu Gln Arg Ser Thr  
525 530 535

Glu Arg Thr Asn Thr Lys Leu Pro Asp Ile Cys Asn Thr Cys Phe Lys  
540 545 550

Asn Tyr Cys Trp Asp Gly Lys Thr Asn Ser Thr Thr Pro Ala Pro Tyr  
555 560 565

Glu Pro Glu Leu Leu Met Glu Ala Ser Thr Ser Gly Ala Ser Lys Asp

570 575 580 585

Gln Leu Asn Arg Thr Ala Ala Val Ile Ala Phe Ala Val Met Phe Phe  
590 595 600

Met Thr Ile

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 2233

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Aspergillus oryzae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (79) .. (2001)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_péptido

&lt;222&gt; (193) .. ()

&lt;400&gt; 7

```

gcaattcctt cgacattgct cgaaaaaaaa caacgtgtcg ctctcacgta gaactgtgtg      60
cgaccacttc aggtcagt atg aaa ccc aca acä gct gca att gct tta gcc      111
          Met Lys Pro Thr Thr Ala Ala Ile Ala Leu Ala
          -35          -30

ggg ttg ctg tct ggc gtg aca gcg gcc cca ggc cct cat gga gaa agg      159
Gly Leu Leu Ser Gly Val Thr Ala Ala Pro Gly Pro His Gly Glu Arg
          -25          -20          -15

att gag agg att gat aga act gtg ttg gaa cgt gca ttg cca aat gct      207
Ile Glu Arg Ile Asp Arg Thr Val Leu Glu Arg Ala Leu Pro Asn Ala
          -10          -5          -1 1          5

ccc gat gga tat gta cgg tcc aac gtc agt tgt cct gcg aat cgc cgg      255
Pro Asp Gly Tyr Val Pro Ser Asn Val Ser Cys Pro Ala Asn Arg Pro
          10          15          20

acg gtg cgt agc gca tca tcc ggg ctc tog agc aat gag acc tcg tgg      303
Thr Val Arg Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ser Ser Asn Glu Thr Ser Trp
          25          30          35

ttg aaa acc cga cgg gag aag act caa tct gcc atg aaa gat ttc ttc      351
Leu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Thr Gln Ser Ala Met Lys Asp Phe Phe
          40          45          50

aac cat gtc acg att aag gac ttt gat gct gtc caa tat ctc gac aac      399
Asn His Val Thr Ile Lys Asp Phe Asp Ala Val Gln Tyr Leu Asp Asn
          55          60          65

cac tcg agt aac acg tcc aat ctt ccc aat att ggt att gcg gtg tct      447
His Ser Ser Asn Thr Ser Asn Leu Pro Asn Ile Gly Ile Ala Val Ser
          70          75          80          85

ggg gga ggt tat cgc gcc ctg atg aac ggt gcc gga gcg atc aaa gcg      495
Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala

```

90	95	100	
ttt gat agc cga acg gag aac tcg acg gcg acg gga cag ttg ggt ggt Phe Asp Ser Arg Thr Glu Asn Ser Thr Ala Thr Gly Gln Leu Gly Gly 105 110 115			543
ctg cta cag tcg gcg acg tat ctg gct ggt ctg agt ggt ggt gga tgg Leu Leu Gln Ser Ala Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp 120 125 130			591
ctg gtg ggg tcg atc tat atc aac aat ttc acc acc att tca gca ctg Leu Val Gly Ser Ile Tyr Ile Asn Asn Phe Thr Thr Ile Ser Ala Leu 135 140 145			639
cag acc cat gag gat ggt gct gtc tgg cag ttt caa aac tcg att ttt Gln Thr His Glu Asp Gly Ala Val Trp Gln Phe Gln Asn Ser Ile Phe 150 155 160 165			687
gag ggc cct gac ggc gat agc att cag att ctg gat tct gcg act tac Glu Gly Pro Asp Gly Asp Ser Ile Gln Ile Leu Asp Ser Ala Thr Tyr 170 175 180			735
tac aag cac gtt tac gat gca gtg caa gac aag aag gat gcg gga tac Tyr Lys His Val Tyr Asp Ala Val Gln Asp Lys Lys Asp Ala Gly Tyr 185 190 195			783
gaa acc tct atc act gat tat tgg ggt cgc gct ctc tct tat caa tta Glu Thr Ser Ile Thr Asp Tyr Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu 200 205 210			831
atc aat gct acc gac ggc ggt ccg agc tat act tgg tcg tcc att gcc Ile Asn Ala Thr Asp Gly Gly Pro Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala 215 220 225			879
cta acc gat aca ttt aag cag gca gat atg ccg atg cct ctc ctc gtt Leu Thr Asp Thr Phe Lys Gln Ala Asp Met Pro Met Pro Leu Leu Val 230 235 240 245			927
gcc gac ggt cgg tat ccc gat gag ctc gtg gtc agc agc aac gct act Ala Asp Gly Arg Tyr Pro Asp Glu Leu Val Val Ser Ser Asn Ala Thr 250 255 260			975
gtc tat gag ttt aac cct tgg gag ttt ggt act ttt gat cca aca gtc Val Tyr Glu Phe Asn Pro Trp Glu Phe Gly Thr Phe Asp Pro Thr Val 265 270 275			1023
tac ggg ttt gtg cct cta gaa tac gta ggc tct aaa ttc gac ggt ggt Tyr Gly Phe Val Pro Leu Glu Tyr Val Gly Ser Lys Phe Asp Gly Gly 280 285 290			1071
tct atc ccc gac aac gag acc tgt gta cgc gga ttc gac aac gcc ggt Ser Ile Pro Asp Asn Glu Thr Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly 295 300 305			1119
ttt gtt atg ggt act tcg tca agt ttg ttc aac cag ttc ttc ctg cag Phe Val Met Gly Thr Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Phe Leu Gln 310 315 320 325			1167
gtt aac tca act tcg ctt cct gat ttc ctg aag acg gca ttc tcg gac Val Asn Ser Thr Ser Leu Pro Asp Phe Leu Lys Thr Ala Phe Ser Asp 330 335 340			1215

atc ttg gca aag att ggt gaa gaa gat gag gac att gct gtc tat gca Ile Leu Ala Lys Ile Gly Glu Glu Asp Glu Asp Ile Ala Val Tyr Ala 345 350 355	1263
ccc aac ccg ttc tac aat tgg gcc ccc gtg agc tca cca gca gcc cat Pro Asn Pro Phe Tyr Asn Trp Ala Pro Val Ser Ser Pro Ala Ala His 360 365 370	1311
caa cag gaa ctc gat atg gtg gac ggt ggc gag gat ctt cag aac att Gln Gln Glu Leu Asp Met Val Asp Gly Gly Glu Asp Leu Gln Asn Ile 375 380 385	1359
cct ctg cat cct tta att cag cca gag cgt cac gta gat gtt atc ttt Pro Leu His Pro Leu Ile Gln Pro Glu Arg His Val Asp Val Ile Phe 390 395 400 405	1407
gct gtt gac tcc tcc gcc gac acg act tat tct tgg ccc aac ggc aca Ala Val Asp Ser Ser Ala Asp Thr Thr Tyr Ser Trp Pro Asn Gly Thr 410 415 420	1455
gct ctc gtt gcc act tac gag cgc agc ctg aac tcc acc ggc atc gct Ala Leu Val Ala Thr Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Ser Thr Gly Ile Ala 425 430 435	1503
aac gga acc tca ttc ccc gcg atc cct gac cag aat acc ttt gtt aac Asn Gly Thr Ser Phe Pro Ala Ile Pro Asp Gln Asn Thr Phe Val Asn 440 445 450	1551
aat ggc ttg aat acg cgg cca acg ttc ttc gga tgt aac agt acg aac Asn Gly Leu Asn Thr Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asn Ser Thr Asn 455 460 465	1599
acc aca ggc cct acg cct ttg gtt gtc tac ctt ccg aac tat cca tac Thr Thr Gly Pro Thr Pro Leu Val Val Tyr Leu Pro Asn Tyr Pro Tyr 470 475 480 485	1647
gtg tct tac tcg aac tgg tca acc ttc cag cca agc tat gag atc tcc Val Ser Tyr Ser Asn Trp Ser Thr Phe Gln Pro Ser Tyr Glu Ile Ser 490 495 500	1695
gaa aga gac gac acc atc cgc aac gga tat gat gtg gtg acg atg ggt Glu Arg Asp Asp Thr Ile Arg Asn Gly Tyr Asp Val Val Thr Met Gly 505 510 515	1743
aac agc act cgt gat ggt aac tgg acg acc tgc gtc ggt tgt gct att Asn Ser Thr Arg Asp Gly Asn Trp Thr Thr Cys Val Gly Cys Ala Ile 520 525 530	1791
ctg agt cgg tct ttc gag cgc acg aac acc cag gtt ccg gat gcc tgc Leu Ser Arg Ser Phe Glu Arg Thr Asn Thr Gln Val Pro Asp Ala Cys 535 540 545	1839
acc cag tgc ttc cag aag tac tgc tgg gat ggc act acg aac tcc acc Thr Gln Cys Phe Gln Lys Tyr Cys Trp Asp Gly Thr Thr Asn Ser Thr 550 555 560 565	1887
aac tct gcc gac tat gag cct gtc acc ctg ttg gag gat agt gct ggt Asn Pro Ala Asp Tyr Glu Pro Val Thr Leu Leu Glu Asp Ser Ala Gly 570 575 580	1935

tcc gct ctc tcc cgg gct gtc atc acc acc atc gta gcg acc agt gct 1983  
 Ser Ala Leu Ser Pro Ala Val Ile Thr Thr Ile Val Ala Thr Ser Ala  
           585                  590                  595

gct ctt ttc acc ttg ctg tgagactgga gcaattctgt tggatacggc 2031  
 Ala Leu Phe Thr Leu Leu  
           600

ttctctcttc tttctcttc ccaggaacta cttttatata tattgcgata tatcccgact 2091

tttttttttg cttctcttca attcttctct cctgtgcctt ttagcttgat tgtattttaag 2151

ttacatctcg gccttggcac ggtccttttt gaatatattt ctggattacc caaaaaaaaaa 2211

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2233

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 641

&lt;212&gt; PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

&lt;400&gt; 8

Met Lys Pro Thr Thr Ala Ala Ile Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ser Gly  
 -35 -30 -25

Val Thr Ala Ala Pro Gly Pro His Gly Glu Arg Ile Glu Arg Ile Asp  
 -20 -15 -10

Arg Thr Val Leu Glu Arg Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asp Gly Tyr Val  
 -5 -1 1 5 10

Pro Ser Asn Val Ser Cys Pro Ala Asn Arg Pro Thr Val Arg Ser Ala  
 15 20 25

Ser Ser Gly Leu Ser Ser Asn Glu Thr Ser Trp Leu Lys Thr Arg Arg  
 30 35 40

Glu Lys Thr Gln Ser Ala Met Lys Asp Phe Phe Asn His Val Thr Ile  
 45 50 55

Lys Asp Phe Asp Ala Val Gln Tyr Leu Asp Asn His Ser Ser Asn Thr  
 60 65 70

Ser Asn Leu Pro Asn Ile Gly Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg  
 75 80 85 90

Ala Leu Met Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala Phe Asp Ser Arg Thr  
 95 100 105

Glu Asn Ser Thr Ala Thr Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ala



110                      115                      120  
 Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Gly Gly Trp Leu Val Gly Ser Ile  
 125                      130                      135  
 Tyr Ile Asn Asn Phe Thr Thr Ile Ser Ala Leu Gln Thr His Glu Asp  
 140                      145                      150  
 Gly Ala Val Trp Gln Phe Gln Asn Ser Ile Phe Glu Gly Phe Asp Gly  
 155                      160                      165                      170  
 Asp Ser Ile Gln Ile Leu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Lys His Val Tyr  
 175                      180                      185  
 Asp Ala Val Gln Asp Lys Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Ile Thr  
 190                      195                      200  
 Asp Tyr Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Leu Ile Asn Ala Thr Asp  
 205                      210                      215  
 Gly Gly Pro Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Thr Asp Thr Phe  
 220                      225                      230  
 Lys Gln Ala Asp Met Pro Met Pro Leu Leu Val Ala Asp Gly Arg Tyr  
 235                      240                      245                      250  
 Pro Asp Glu Leu Val Val Ser Ser Asn Ala Thr Val Tyr Glu Phe Asn  
 255                      260                      265  
 Pro Trp Glu Phe Gly Thr Phe Asp Pro Thr Val Tyr Gly Phe Val Pro  
 270                      275                      280  
 Leu Glu Tyr Val Gly Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Ile Pro Asp Asn  
 285                      290                      295  
 Glu Thr Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr  
 300                      305                      310  
 Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Phe Leu Gln Val Asn Ser Thr Ser  
 315                      320                      325                      330  
 Leu Pro Asp Phe Leu Lys Thr Ala Phe Ser Asp Ile Leu Ala Lys Ile  
 335                      340                      345  
 Gly Glu Glu Asp Glu Asp Ile Ala Val Tyr Ala Pro Asn Pro Phe Tyr  
 350                      355                      360

Asn Trp Ala Pro Val Ser Ser Pro Ala Ala His Gln Gln Glu Leu Asp  
365 370 375

Met Val Asp Gly Gly Glu Asp Leu Gln Asn Ile Pro Leu His Pro Leu  
380 385 390

Ile Gln Pro Glu Arg His Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser  
395 400 405 410

Ala Asp Thr Thr Tyr Ser Trp Pro Asn Gly Thr Ala Leu Val Ala Thr  
415 420 425

Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Ser Thr Gly Ile Ala Asn Gly Thr Ser Phe  
430 435 440

Pro Ala Ile Pro Asp Gln Asn Thr Phe Val Asn Asn Gly Leu Asn Thr  
445 450 455

Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asn Ser Thr Asn Thr Thr Gly Pro Thr  
460 465 470

Pro Leu Val Val Tyr Leu Pro Asn Tyr Pro Tyr Val Ser Tyr Ser Asn  
475 480 485 490

Trp Ser Thr Phe Gln Pro Ser Tyr Glu Ile Ser Glu Arg Asp Asp Thr  
495 500 505

Ile Arg Asn Gly Tyr Asp Val Val Thr Met Gly Asn Ser Thr Arg Asp  
510 515 520

Gly Asn Trp Thr Thr Cys Val Gly Cys Ala Ile Leu Ser Arg Ser Phe  
525 530 535

Glu Arg Thr Asn Thr Gln Val Pro Asp Ala Cys Thr Gln Cys Phe Gln  
540 545 550

Lys Tyr Cys Trp Asp Gly Thr Thr Asn Ser Thr Asn Pro Ala Asp Tyr  
555 560 565 570

Glu Pro Val Thr Leu Leu Glu Asp Ser Ala Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
575 580 585

Ala Val Ile Thr Thr Ile Val Ala Thr Ser Ala Ala Leu Phe Thr Leu  
590 595 600

Leu

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial / Desconocida  
 <220>  
 <221> misc\_característica  
 <222> (9) .. ()  
 <223> cgta  
 <220>  
 <221> misc\_característica  
 <222> () .. ()  
 <223> HU175  
 <400> 9

tggggcccgg cactgtctta ccaactgac

30

<210> 10  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial / Desconocida  
 <220>  
 <221> misc\_característica  
 <222> () .. ()  
 <223> HU176  
 <400> 10

cggttccagc agtacctgac aaaacacgt

29

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> () .. ()

<223> HU188

<400> 11

tttgátatca gacatgaagt tacctgcact

30

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> () .. ()

<223> HU189

<400> 12

tttctcgagt cacatcatcc aaaccccaac

30

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> () .. ()

<223> HU212

<400> 13

gcnytnccna aygncncnga yggnta

26

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> () .. ()

<223> HU213

<220>

<221> misc-característica

<222> (19) .. ()

<223> cgta

<400> 14

rtcyttccar taytcnncng t

21

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> ()..()

<223> HU225

<400> 15

tttagatcta gtcatgaagt tgcctctctt tgc

33

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> ()..()

<223> HU226

<400> 16

gtttaaacta cagcataaac gcagcaacac

30

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_característica

<222> ()..()

<223> HU219

<400> 17

ctcgaggac ccaacttcga ccac

24

<210> 18

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial / Desconocida

<220>

<221> misc\_caracteristica

<222> () .. ()

<223> HU244

<400> 18

gtttaaacta cacactgggt tcataagctc

30

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Aspergillus niger

<400> 19

Ile Val Ser Thr Val Glu Tyr Trp Lys Asp Ile Thr Glu Glu Val Thr  
1                    5                    10                    15

Gly Lys Lys Asn Ala Ala  
20

### REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una lisofosfolipasa que es:

a) un polipéptido codificado por una parte codificadora de lisofosfolipasa de la secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* depósito número DSM 13003, DSM 13004, DSM 13082 o DSM 13083, o

b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como el péptido maduro que se muestra en SEC ID NO: 2, 4, 6, u 8, o que puede derivar de las mismas por sustitución, deleción y / o inserción de uno o más aminoácidos, en particular por deleción de 25 - 35 aminoácidos en el terminal C;

c) un análogo del polipéptido definido en a) o b) que:

i) tiene por lo menos 70 % de homología con dicho polipéptido,

ii) es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo producido contra dicho polipéptido en forma purificada, o

iii) es una variante alélica de dicho polipéptido; o

d) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de alta severidad con una hebra complementaria de la secuencia de ácido nucleico que se muestra como los nucleótidos 109 - 1920 de SEC ID NO: 1, 115 - 1914 de SEC ID NO: 3, 70 - 1881 de SEC ID NO: 5 ó 193 - 2001 de SEC ID NO: 7, o una subsecuencia de las mismas que tiene por lo menos 100 nucleótidos.

2. La lisofosfolipasa de la reivindicación 1, que es natural de una cepa de *Aspergillus*, con preferencia, *A. niger* o *A. oryzae*.



3. Una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a la lisofosfolipasa de la reivindicación 1 ó 2.
4. Una secuencia de ácido nucleico que comprende:
  - a) la parte codificadora de lisofosfolipasa de la secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* DSM 13003, DSM 13004, DSM 13082 o DSM 13083,
  - b) la secuencia de ácido nucleico que se muestra como los nucleótidos 109 - 1920 de SEC ID NO: 1, 115 - 1914 de SEC ID NO: 3, 70 - 1881 de SEC ID NO: 5, ó 193 - 2001 de SEC ID NO: 7,
  - c) un análogo de la secuencia que se define en a) o b) que codifica a una lisofosfolipasa y
    - i) tiene por lo menos 70 % de homología con dicha secuencia de ADN, o
    - ii) hibrida a alta severidad con una hebra complementaria de dicha secuencia de ADN, o una subsecuencia de la misma que tiene por lo menos 100 nucleótidos,
    - iii) es una variante alélica de la misma, o
  - d) una hebra complementaria de a), b) o c).
5. Una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 3 ó 4 operablemente ligada a una o más secuencias de control capaz de dirigir la expresión de la lisofosfolipasa en un huésped de expresión adecuado.
6. Un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 5, un promotor y señales de detención de traducción y transcripción.
7. Una célula huésped recombinante transformada con la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 6.

8. Un método para la producción de una lisofosfolipasa que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7, bajo condiciones que conducen a la producción de la lisofosfolipasa, y recuperar la lisofosfolipasa.
9. El método de la reivindicación precedente, en donde la lisofosfolipasa puede derivar del péptido maduro de SEC ID NO: 2, 4, 6, u 8, o es un análogo del mismo, y la célula huésped es una cepa transformada de *A. oryzae*.
10. Un proceso para hidrolizar grupos acilo grasos en un fosfolípido o lisofosfolípido, que comprende tratar el fosfolípido o lisofosfolípido con la lisofosfolipasa de la reivindicación 1 ó 2.
11. Un proceso para perfeccionar la capacidad de filtración de una suspensión o solución acuosa de origen de hidrato de carbono que contiene fosfolípido, cuyo proceso comprende tratar la suspensión o solución con la lisofosfolipasa de la reivindicación 1 ó 2.
12. El proceso de la reivindicación precedente, en donde la suspensión o solución contiene un hidrolizado de almidón, en particular un hidrolizado de almidón de trigo.

p. p. NOVO NORDISK A/S

### RESUMEN

Los inventores han aislado lisofosfolipasas de *Aspergillus* (*A.niger* y *A. oryzae*) que tienen masas moleculares de aproximadamente 68 kDa y secuencias de aminoácidos de 600 - 604 residuos de aminoácidos. Las nuevas lisofosfolipasas sólo tienen una limitada homología a secuencias de aminoácidos conocidas. Los inventores además aislaron genes que codifican a las nuevas enzimas y los clonaron en cepas de *E. coli*.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**